

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DO ULTRASSOM PULSADO
DE BAIXA INTENSIDADE E DA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA CARREADA EM GEL DE
QUITOSANA NO REPARO DA FALHA ÓSSEA EM RÁDIO
DE COELHOS**

Nicole Maria Zanetti

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DO ULTRASSOM PULSADO
DE BAIXA INTENSIDADE E DA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA CARREADA EM GEL DE
QUITOSANA NO REPARO DA FALHA ÓSSEA EM RÁDIO
DE COELHOS**

Nicole Maria Zanetti

Orientador: Prof. Dr. João Guilherme
Padilha Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para defesa da dissertação para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2009

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Tecido ósseo	3
2.1.1. Consolidação óssea	4
2.1.2. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.....	5
2.1.2.1. Fosfatase alcalina	7
2.1.2.2. Ciclo circadiano	8
2.1.3. Falhas da consolidação óssea.....	9
2.2. Osteoindução	10
2.3. Piezoelectricidade	10
2.4. Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade no tecido ósseo.....	10
2.4.1. Mecanismos de interação do ultrassom pulsado de baixa intensidade na consolidação óssea.....	12
2.4.2. Efeitos térmicos do ultrassom pulsado de baixa intensidade.....	13
2.4.3. Efeitos não-térmicos do ultrassom pulsado de baixa intensidade.....	14
2.5. Proteína morfogenética óssea (BMP).....	15
2.5.1. Carreador.....	16
2.5.1.1. Gel de quitosana	17
2.6. Interação do ultrassom pulsado de baixa intensidade e proteína morfogenética óssea.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Animais	22
4.2. Montagem dos grupos	22
4.2.1. Grupos experimentais e controle.....	23
4.3. Procedimento cirúrgico e eutanásia.....	25
4.4. Gel de quitosana e rhBMP-2.....	28
4.4.1. Preparação do gel de quitosana	28

4.4.2. Proteína morfogenética óssea	29
4.5. Ultrassom pulsado de baixa intensidade	29
4.6. Avaliação pós-operatória	31
4.6.1. Avaliação clínico-cirúrgica.....	31
4.6.2. Avaliação radiográfica	31
4.6.3. Avaliação histomorfométrica	32
4.6.4. Mensuração da fosfatase alcalina.....	34
4.6.5. Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Avaliação clínico-cirúrgica	36
5.2 Avaliação radiográfica	37
5.3. Mensuração da fosfatase alcalina (FA).....	48
5.4. Avaliação histológica	49
5.4.1. Trinta dias.....	49
5.4.2. Quarenta e cinco dias.....	53
5.5. Avaliação histomorfométrica	55
5.5.1. Índice de osteoclastos	55
5.5.2. Superfície osteoblástica	55
5.5.3. Volume trabecular ósseo	56
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Imagem fotográfica do período trans-operatório demonstrando o acesso crânio-medial com exposição do rádio (seta) para posterior confecção da falha óssea	26
2.	Imagem fotográfica do período trans-operatório. A extremidade da pinça Allis foi utilizada para demarcar os limites proximal e distal para posterior confecção da falha óssea (traços amarelas)	27
3.	Imagem fotográfica do período trans-operatório. Note que a dimensão da falha óssea corresponde às dimensões da extremidade da pinça Allis (setas amarelas).....	27
4.	Imagem fotográfica do aparelho de ultrassom pulsado de baixa intensidade, cedido gentilmente pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo (USP)	30
5.	Imagem fotográfica representando a aplicação do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre o local da falha óssea radial.....	31
6.	Imagem radiográfica do pós-operatório imediato demonstrando a radioluscência no local da falha óssea (A) no rádio esquerdo do coelho 5 (GII), livre do gel de quitosana, e (B) rádio direito do coelho 14 (GIV) com falha óssea preenchida com gel de quitosana (setas).....	37
7.	Imagem radiográfica do décimo quinto dia pós-operatório do defeito ósseo em rádio de coelhos. Em A, a falha óssea foi preenchida com o gel de quitosana não-ativado, em B o gel introduzido na falha estava ativado com a rhBMP-2. Note a radiopacidade tipo tecido mole presente em A (setas) e ausente em B.....	38
8.	Imagem radiográfica do décimo quinto dia (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GI (controle). Projeções médio-laterais. As setas indicam a formação de ponte óssea, denotando preenchimento parcial do defeito ósseo. Embora seja possível observar ainda uma linha de radioluscência, o preenchimento da falha foi quase completo	40
9.	Imagem radiográfica do décimo quinto dia (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GII (ultrassom). Projeções médio-laterais. Observe a formação de ponte óssea (seta) que preenche quase toda a falha logo no décimo quinto dia	40
10.	Imagem radiográfica do décimo quinto dia (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GIII (gel de quitosana). Projeções médio-laterais. Note a reação periosteal (seta amarela) e pequena formação de ponte óssea (seta vermelha) denotando baixo preenchimento da falha óssea, até mesmo no último período de avaliação (45 dias)	41

11. Imagem radiográfica do décimo quinto dia (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório.de falha óssea em rádio de coelho do GIV (gel de quitosana e ultrassom). Projeções médio-laterais. Note a sutil reação periosteal no décimo quinto dia pós-operatório (seta amarela) com baixo preenchimento da falha óssea. Apenas no trigésimo diafoi possível observar a formação de ponte óssea (seta vermelha), ainda com baixo preenchimento da falha41
12. Imagem radiográfica do décimo quinto dia (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório.de falha óssea em rádio de coelho do GV (gel de quitosana ativado com rhBMP-2). Projeções médio-laterais. É possível observar o início da formação de ponte óssea (seta vermelha) já nos primeiros quinze dias (A), com aumento do preenchimento no trigésimo dia e fechamento completo do defeito no quadragésimo quinto dia (C).....42
13. Imagem radiográfica do décimo quinto dia (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório.de falha óssea em rádio de coelho do GVI (gel de quitosana ativado com rhBMP-2 e ultrassom). Projeções médio-laterais. Note o preenchimento quase completo da falha óssea no décimo quinto dia (A) com formação de ponte óssea (seta vermelha) e reação periosteal (seta amarela) intensa. Na última avaliação radiográfica (C) observa-se o preenchimento completo do defeito ósseo42
14. Valores médios da concentração da fosfatase alcalina sérica (U/L) de coelhos pertencentes aos grupos GI, GII, GIII, GIV, GV e GVI nos diferentes momentos (M0 a M6). O perfil crescente dos valores dessa enzima foi observado nos grupos GI, GII, GV e GVI, este último apresentando as maiores médias já a partir de M1. O perfil dos valores da FA sérica dos grupos GIII e GIV, embora variável, foi decrescente48
15. Fotomicrografia da região de implante do gel de quitosana no rádio de coelho, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório em que se constatam a presença de fibras de quitosana (ponta da seta vermelha), infiltrado inflamatório (estrelas amarelas), tecido fibroso (triângulo azul) e tecido ósseo mineralizado (losango verde). (Histosec, HE, 40X)50
16. Fotomicrografia de cortes das áreas das falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes aos grupos GI (A), GII (B), GIII (C), GIV(D), GV(E) e GVI(F), eutanasiados aos trinta dias de pós-operatório. As imagens em que se observa a maior quantidade de tecido ósseo em meio a falha óssea são: A, B, E e F. Embora exista tecido ósseo neoformado, é possível observar que o infiltrado inflamatório (triângulos amarelos) em C e D ocupa maior área do defeito. Em D, nota-se que o infiltrado inflamatório é organizado, estando envoldido por tecido fibroso (losango azul). Em

	C, o infiltrado inflamatório que envolve o implante assume caráter não organizado (Histosec, HE, 10X).....	52
17.	Fotomicrografia de cortes das áreas das falhas ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes aos grupos GI (A), GII (B), GIII (C), GIV(D), GV(E) e GVI(F), eutanasiados aos quarenta e cinco dias de pós-operatório. Observa-se que o preenchimento da falha óssea foi mais intenso em A, B, E e F. Em C e D ainda é possível observar a permanência do gel de quitosana envolvido pelo infiltrado inflamatório (triângulo amarelo) e por tecido fibroso. Nota-se um progresso maior do processo de consolidação óssea em E e F, onde se observa a organização do osso lamelar com menor número de espaços trabeculares (Histosec, HE, 40X)	54

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1. Espécies animais, agentes experimentais e tipos de avaliação utilizados em diferentes estudos sobre a consolidação óssea	20
2. Espécies animais, agentes experimentais e tipos de avaliação utilizados em diferentes estudos sobre a consolidação óssea	23
3. Descrição dos parâmetros de formação óssea segundo o sistema de escala de Lane e Sandhu (1987).....	32
4. Achados radiográficos nos diferentes grupos experimentais nos dias 15, 30 e 45 do período pós-operatório.....	39
5. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo controle (GI) - Projeção médio-lateral.....	43
6. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo controle (GI) - Projeção crânio-caudal.....	43
7. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo ultrassom (GII) - Projeção médio-lateral.....	44
8. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo ultrassom (GII) - Projeção crânio-caudal.....	44
9. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana (GIII) - Projeção médio-lateral.....	44
10. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana (GIII) - Projeção crânio-caudal.....	45
11. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e ultrassom (GIV) - Projeção médio-lateral.....	45
12. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e ultrassom (GIV) - Projeção crânio-caudal.....	45
13. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e rhBMP-2 (GV) - Projeção médio-lateral.....	46
14. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e rhBMP-2 (GV) - Projeção crânio-caudal.....	46
15. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana, rhBMP e ultrassom (GVI) - Projeção médio-lateral.....	46

16. Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana, rhBMP-2 e ultrassom (GVI) - Projeção crânio-caudal.47

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Médias e desvios padrão do número de osteoclastos observados por área (mm ²) em relação ao grupo e ao tempo (30 e 45 dias) - Índice Osteoclástico -IO	55
2. Médias e desvios padrão da porcentagem da superfície ocupada por osteoblastos (superfície osteoblástica) de acordo com o grupo, aos 30 e 45 dias	56
3. Médias e desvios padrão da porcentagem do volume trabecular ósseo de acordo com o grupo, aos 30 e 45 dias	56

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DO ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE E DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA CARREADA EM GEL DE QUITOSANA NO REPARO DA FALHA ÓSSEA EM RÁDIO DE COELHOS

RESUMO - Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente os efeitos do emprego do ultrassom pulsado de baixa intensidade e da proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) sobre a consolidação do osso *in vivo*. Foram realizadas ostectomias bilaterais do rádio de 24 coelhos machos, da raça Nova Zelândia Branco, seguido da análise qualitativa (avaliação clínica, histológica e radiográfica) e quantitativa (histomorfometria óssea e bioquímica) da falha óssea preenchida ou não com gel de quitosana. Denominaram-se seis grupos experimentais com quatro animais cada (G1 – grupo controle, GII – grupo ultrassom, GIII – grupo quitosana, GIV – grupo quitosana e ultrassom, GV – grupo quitosana e rhBMP-2 e GVI – grupo quitosana, rhBMP-2 e ultrassom). As avaliações radiográficas e a mensuração da fosfatase alcalina sérica foram executadas durante o período experimental. Os fragmentos de tecido provenientes da falha óssea dos coelhos sacrificados no 30^o e 45^o dia foram submetidos à avaliação histológica e histomorfométrica. Os diferentes métodos de avaliação empregados neste estudo demonstraram que o preenchimento do defeito ósseo foi superior nos casos em que foi empregada a terapia ultrassônica associada à implantação do gel ativado com a proteína osteoindutora. Os coelhos que receberam o implante livre da proteína (GIII e GIV) tiveram o processo de reparo ósseo comprometido. Foi possível concluir que o ultrassom acelerou o preenchimento da falha óssea e que o gel de quitosana, embora tenha induzido processo inflamatório, foi capaz de carrear a rhBMP-2, permitindo a ação sinérgica entre o ultrassom e a proteína.

Palavras-chave: ultrassom, consolidação óssea, proteína morfogenética óssea, quitosana

EFFECTS OF LOW INTENSITY ULTRASOUND AND BONE MORPHOGENETIC PROTEIN IN CHITOSAN GEL CARRIER ON REPAIR OF RABBIT RADIAL BONE DEFECT

ABSTRACT - This comparative study evaluated in vivo responses of bone healing under low intensity pulsed ultrasound and bone morphogenetic protein (rhBMP-2) treatment in experimental bone defects filled or not with chitosan gel. Twenty four New Zealand White rabbits were assigned in six experimental groups, four animals each (GI – control group, GII – ultrasound group, GIII – chitosan group, GIV – chitosan plus ultrasound group, GV – chitosan with rhBMP-2 and GVI – chitosan with rhBMP-2 plus ultrasound). It was performed a qualitative (radiographic, histological and clinical evaluation) and quantitative research (histomorphometrical and biochemical analysis) of bone healing. The radiographic and serum alkaline phosphatase evaluation was performed during the experimental period. Histological and bone histomorphometry was applied for bone sample evaluation from sacrificed rabbits (30th and 45th days). The different evaluation methods used in this study showed that defect filling was improved when the treatment was based on the association between ultrasound and activated chitosan gel. The bone defects filled with non-activated gel (GIII and GIV) showed a delay in bone healing. This study had demonstrate that low intensity ultrasound improves bone healing process, that chitosan gel is a good carrier for rhBMP-2 even when it induced an inflammatory reaction, allowing a synergetic effect between ultrasound and protein.

Keywords: ultrasound, bone healing, bone morphogenetic protein, chitosan.

1 INTRODUÇÃO

Embora a consolidação óssea seja um processo biológico aperfeiçoado, estima-se que 5 a 10% das fraturas em humanos apresentam complicações no processo de consolidação (EINHORN, 1995). Em animais, sabe-se que a incidência destas complicações é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal, mas ainda não existem dados que expressem estatisticamente a sua ocorrência.

Na literatura compulsada relacionada à ortopedia, já existem diversos estudos acerca da utilização de métodos alternativos de estimulação do reparo ósseo. Tais métodos foram desenvolvidos objetivando acelerar o processo de consolidação de fraturas recentes e tratamento de problemas de união óssea e pseudoartrose (MAYR et. al., 2000). Estas técnicas também colaboram com a redução do tempo de recuperação bem como no custo do tratamento, garantindo retorno precoce da função do membro. Em medicina veterinária estas necessidades se tornam ainda maiores pela dificuldade de se promover repouso adequado aos pacientes e, dessa forma, impedir a sobrecarga precoce ao osso fraturado (MORAES, 2006).

A busca por agentes capazes de estimular a consolidação óssea teve início com a descoberta de duas propriedades do osso, a osteoindução e a piezoelectricidade. Desde então inúmeros estudos e experimentos têm sido conduzidos para avaliar a ação e os efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade e das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, *do Inglês Bone Morphogenetic Protein*) sobre processo fisiológico da consolidação óssea (SANT'ANNA et. al., 2005). No entanto a ação da BMP ou de qualquer outra substância osteoindutora depende diretamente da eficiência do agente carreador (TORIUMI-ROBERTSON, 1993). Atendendo a todos os requisitos para um carreador de moléculas bioativas, López-Lacomba et al. (2006) apresentam os bons efeitos do emprego da quitosana. Diversos estudos já comprovam que, tanto o ultrassom pulsado de baixa intensidade quanto às proteínas morfogenéticas ósseas, têm efeito positivo sobre a consolidação do osso (LINKHART et. al., 1996,

AZUMA, et. al., 2001, CHEN et. al., 2003, SANTOS et. al., 2005). A maioria dos estudos avaliou distintamente a eficiência ou o mecanismo de ação de cada agente químico ou mecânico, ou seja, foi analisado o efeito de apenas um agente sobre a consolidação óssea. Somente em um estudo avaliou-se a expressão gênica de uma cultura de células ósseas de ratos exposta a ação do ultrassom pulsado de baixa intensidade ou da proteína morfogenética óssea, ou em combinação. Este trabalho realizou um estudo comparativo dos efeitos da utilização do ultrassom pulsado de baixa intensidade e a proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) sobre a consolidação do osso *in vivo*, que foram avaliados por meio da análise qualitativa (avaliação clínica e radiográfica) e quantitativa (histomorfometria óssea e bioquímica) do defeito ósseo produzido no rádio de coelhos, preenchido ou não com gel de quitosana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo pode ser considerado uma forma altamente especializada do tecido conjuntivo, no qual a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez e mantendo certo grau de elasticidade. Além da sua função de suporte, o osso é a maior reserva primária de cálcio para o organismo (DEMPSTER, 1999).

A matriz óssea é composta por substâncias orgânicas, constituída por colágeno tipo I, proteoglicanas e proteínas não colágenas. A porção inorgânica é basicamente constituída por sais de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990; LIRANI, 2004).

Macroscopicamente, o osso divide-se em cortical e esponjoso. O osso cortical é denso, presente no eixo de ossos longos, em que a matriz do colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o então Sistema de Havers. A comunicação entre os canais centrais e a cavidade medular óssea é denominada como Canal de Volkmann (MORAES, 2006). A superfície óssea externa é revestida por uma membrana denominada perióstio e a superfície interna, pelo endóstio. Ambas são responsáveis pela nutrição do osso, além de servir como fonte de osteoblastos para a osteogênese (KAPLAN et. al., 1994; LIRANI, 2004).

Já o osso esponjoso ou trabecular, apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas preenchidas por medula óssea vermelha, repleta de células mesenquimais (BETTI, 2004).

As principais células ósseas são os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, todas derivando da mesma origem, a célula osteoprogenitora (LIRANI, 2004).

A consolidação óssea é um complexo, porém bem orquestrado processo regenerativo em resposta a uma lesão, que resulta em reparo ósseo e restauração da função do osso (DIMITRIOU et al., 2005).

2.1.1 Consolidação óssea

Em termos histológicos, a consolidação óssea tem sido dividida em consolidação direta (primária) e indireta (secundária). A consolidação óssea direta ocorre apenas quando há redução anatômica dos fragmentos da fratura, feita por meio de fixação interna rígida com movimentação interfragmentária mínima (Mc KIBBIN, 1978). Por meio deste processo, a córtex tenta restabelecer os Sistemas Haversianos por meio da formação de discretas unidades de remodelação, na tentativa de restabelecer a continuidade mecânica (Mc KIBBIN, 1978). As células vasculares endoteliais e mesenquimais perivasculares fornecem células osteoprogenitoras que se transformarão em osteoblastos (DIMITRIOU et al., 2005) e durante este processo a formação de calo ósseo pode ser mínima ou nula (EINHORN, 1998)

A maioria dos reparos ósseos ocorre por via indireta (DIMITRIOU et al., 2005). Durante este processo ocorre a ossificação intramembranosa e endocondral, com consequente formação de calo ósseo (EINHORN, 1998). Em ordem cronológica, as divisões temporais da consolidação óssea secundária são: formação do hematoma, inflamação, angiogênese, formação de cartilagem (com subsequente calcificação, remoção da cartilagem e formação de novo osso) e a remodelação óssea. Primariamente, ocorre derrame sanguíneo proveniente dos vasos do osso, perióstio e medula óssea, dando origem ao hematoma que participa ativamente do recrutamento de células para o local da fratura (CLAES; WILLIE, 2007). Ocorre o edema, que é então seguido pela fase inflamatória que tem início com a chegada dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos no sítio de injúria, tendo como principal função a remoção dos debris celulares. Com o desenvolvimento do hematoma e proliferação vascular, se inicia a fase da angiogênese. Na ausência da fase inflamatória, não ocorre a consolidação óssea (PHILLIPS, 2005). As principais moléculas envolvidas que controlam a cascata de eventos inflamatórios são: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de transformação do crescimento β (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico (FGF) (do inglês, fator de crescimento

derivado de plaquetas (PGDF) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Essencialmente, segundo Phillips (2005), a ação de cada fator de crescimento pode ser resumida em :

- TGF- β proveniente de plaquetas, matriz óssea e cartilagem, é responsável pela estimulação e diferenciação das células mesenquimais;
- BMPs: proveniente das células osteoprogenitoras, osteoblastos e matriz óssea extracelular, promove a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos e osteoblastos, e células osteoprogenitoras em osteoblastos.
- FGF: proveniente de macrófagos, condrócitos e osteoblastos, é mitogênico para células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos
- PDGF: proveniente de plaquetas e osteoblastos, é mitogênico para células mesenquimais e osteoblastos.

As células mesenquimais do hematoma proliferam e se diferenciam, iniciando a formação do calo ósseo. A formação do calo ósseo intramembranoso, ou calo duro, se inicia no perióstio, em local pouco distante do local da fratura (PHILLIPS, 2005). O calo ósseo mole, que pode ser constituído por colágeno ou tecido fibroso , envolve externamente o local da fratura. Após alguns dias, se inicia a formação de novo osso endocondral, que ocorre simultaneamente ao desenvolvimento do calo periosteal. Durante a fase de remodelação, o calo ósseo é reabsorvido e remodelado pelas forças que atuam no osso (BETTI, 2004), processo este que permanece ativo durante vários anos (WENDEBERG, 1961). Contudo, por um longo período, a densidade mineral do osso reparado será menor que a do osso normal (CLAES e WILLIE, 2007).

2.1.2 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Os marcadores bioquímicos da atividade das células ósseas têm sido amplamente empregados no estudo de distúrbios metabólicos em humanos tais como o hiperparatireoidismo e osteoporose (CHRISTGAU et al., 2000). Alguns estudos com animais relatam o uso dos marcadores ósseos para avaliação dos

efeitos hormonais e diagnóstico de distúrbios do metabolismo ósseo bem como para determinação dos diferentes níveis de formação e reabsorção óssea em cavalos (LEPAGE, et al., 1991) e gatos (DELAURIER et al., 2004) de diferentes faixas etárias. Existem diversos estudos, tanto em humanos quanto em animais, relatando o emprego dos marcadores ósseos no monitoramento do processo de osteogênese na distração óssea, não união e consolidação óssea retardada e consolidação óssea de fraturas experimentais (ALLEN, 2003).

Na medicina humana, o emprego dos métodos de mensuração dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo geralmente é associado à avaliação histomorfométrica, radiográfica e de densitometria óssea, sendo bastante útil no diagnóstico e acompanhamento terapêutico de alguns distúrbios como, por exemplo, a doença de Paget e a osteoporose etária ou pós-menopausa (JORGETTI, 2007).

Embora a análise histomorfométrica óssea ainda seja considerada o método padrão para quantificar a taxa de remodelação óssea, o estudo dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo representa um método alternativo não-invasivo à biópsia óssea, que permite avaliar a atividade de formação e reabsorção das células ósseas. Desta forma é possível acompanhar a progressão de uma doença ou a resposta do tecido ósseo à determinada terapia. Diferentemente das biópsias ósseas, as diversas e repetidas avaliações dos marcadores séricos não interferem no metabolismo ósseo (FROST, 1983).

Para serem considerados clinicamente válidos, estes marcadores devem ser sensíveis e específicos às variações da atividade das células ósseas, porém livres de influências de ações do metabolismo não ósseo. Diversos marcadores bioquímicos estão correlacionados a atividade osteoblástica (formação óssea) e osteoclástica (reabsorção óssea) (ALLEN, 2003). Entre os marcadores bioquímicos que expressam formação óssea, citam-se a fosfatase alcalina total, osteocalcina e propeptídeos de colágeno tipo I. Os telopeptídeos de colágeno tipo I, piridinolina e a hidroxiprolina são alguns dos marcadores bioquímicos que expressam a taxa de reabsorção óssea (KLEEREKOPER, 2005).

Durante o processo de consolidação óssea normal ocorre aumento da atividade osteoblástica. Durante este evento, os osteoblastos secretam grande quantidade de fosfatase alcalina (MOHAMADNIA et al. ,2007) fato este que caracteriza esta enzima como potencial marcador da formação óssea (ALLEN, 2003).

2.1.2.1 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima sintetizada por diferentes tecidos (ALLEN, 2003). Nos humanos existem quatro isoenzimas da fosfatase alcalina. Dentre estas, ocorre expressão de três isoenzimas no intestino, placenta e células germinativas (PRICE, 1993). Embora a quarta isoenzima da fosfatase alcalina não possua especificidade tecidual, esta é mais abundante no fígado, rins e tecido ósseo.

São descritas quatro variantes da fosfatase alcalina nos animais domésticos, entre elas a fosfatase alcalina óssea (sintetizada pelos osteoblastos), intestinal, hepática e corticosteróide-induzido. Um estudo que avaliou comparativamente a eficácia da fosfatase alcalina total e de sua isoforma óssea como marcadores bioquímicos da formação óssea em cães, demonstrou que houve aumento da fosfatase alcalina total similar ao aumento da fosfatase alcalina óssea (MOHAMADNIA et al.,2007). No estudo conduzido por Komnenou et al. (2005), o emprego da fosfatase alcalina total como marcador bioquímico da consolidação óssea foi bem sucedido. Concluiu-se que o aumento dos níveis da enzima foi decorrente da atividade osteoblástica, justificado pela exclusão da possibilidade do aumento de outras isoformas da fosfatase alcalina (isto é, hepática e corticóide-induzida).

Atualmente tem-se associado à monitoração radiográfica e avaliação física ao monitoramento dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, a fim de prever o risco da ocorrência de complicações no processo de consolidação óssea, ajudando o clínico intervir corretamente (KOMNENOU et al., 2005). Embora

a fosfatase alcalina óssea seja considerada o marcador ósseo mais específico (MOHAMADNIA et al., 2005), as técnicas de dosagem são relativamente complexas e variáveis. Contudo, as técnicas de mensuração dos níveis séricos de fosfatase alcalina são simples e amplamente disponíveis (KLEEREKOPER, 2005), fator que potencializa a incorporação da mensuração da fosfatase alcalina sérica como método de avaliação bioquímica do metabolismo ósseo na rotina clínica tanto da medicina humana quanto veterinária.

Sendo este estudo realizado em coelhos, nesta espécie o aumento dos níveis de fosfatase alcalina está relacionado às obstruções biliares, neoplasias, coccidiose hepática (HARCOURT-BROWN, 2002) e doenças intestinais (JENKINS, 2000). Collins (1988) relata que a concentração de fosfatase alcalina no soro de coelhos saudáveis varia entre 4,1 a 16,2U/L.

2.1.2.2 Ciclo circadiano

Vários fatores estão relacionados à variabilidade biológica dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, incluindo idade, sexo, nutrição, exercícios e doenças sistêmicas (SOUBERBIELLE et al., 1999, WATTS, 1999). Adicionalmente, devem-se considerar as variações diurnas, diárias e sazonais ao avaliar os marcadores ósseos (ALLEN, 2003). Estas variações diurnas já foram documentadas em animais de diversas espécies, incluindo ratos (MÜHLBAUER; FLEISCH, 1995), camundongos (TONNA et al., 1987), coelhos (HANSSON, et al. 1974), cavalos (BLACK et al., 1999) e até mesmo em seres humanos (PEDERSEN et al., 1995).

O estudo conduzido por Illera et al. (1992) avaliou as variações fotoperiódicas de algumas constantes bioquímicas sanguíneas de coelhos. Os animais foram mantidos em cinco diferentes ciclos circadianos e, embora a maioria dos parâmetros tenha se mantido dentro da faixa fisiológica, o ciclo que apresentou

menor interferência sobre os parâmetros bioquímicos foi o ciclo de 12 horas de exposição luminosa e 12 horas de escuro (12/12).

Mesmo dentro de um ciclo circadiano 12/12 (12 horas claridade/ 12 horas escuro) é importante fixar um horário específico para colheita do sangue. Alguns estudos experimentais que utilizaram a fosfatase alcalina como marcador ósseo, fixaram o horário no período da manhã para colheita das amostras de sangue: entre 7h e 8h (PASKALEV, et al., 2005) e entre 9h e 9h30 (MOHAMADNIA et al., 2007). Em um estudo conduzido por Allen (2003), afirma-se que o período de maior atividade do metabolismo ósseo foi observado durante o período matutino.

2.1.3 Falhas da consolidação óssea

Estima-se que em humanos, 5% a 10% das fraturas apresentam falhas da consolidação óssea (EINHORN, 1995). Embora seja frequente, não existem dados estimativos sobre a incidência de complicações da consolidação óssea em animais domésticos.

A falha dos eventos do processo de consolidação e as violações dos princípios da cirurgia ortopédica podem causar distúrbios na reparação de fraturas, tendo como consequência a ocorrência de união retardada ou não-união óssea (PERKA et al., 2000; SCHMAEDECKE et al., 2003). O tratamento tradicional de casos de não união óssea é cirúrgico, em que é feita a viabilização dos segmentos ósseos por meio da remoção dos tecidos moles que interferem na cicatrização do osso (MALIZOS et al., 2006), estabilização por fixação externa (SIMONIS et al., 1984; STEIN e ANZEL, 1984) e placas ósseas (BRAUN et al., 1991). Outra opção é a utilização de enxertos ósseos autógenos. Embora apresente bons efeitos, existem limitações relacionadas ao tamanho e quantidade de osso, complicações pós-operatórias relacionadas ao sítio doador, aumento do tempo cirúrgico e estado crítico do paciente que impossibilita a realização de novo procedimento cirúrgico (PERKA et al., 2000, ALBAROVA et al., 2005).

Na tentativa de reduzir o tempo de recuperação, prevenir as complicações da consolidação e oferecer tratamento mais efetivo e menos oneroso, diversos estudos têm avaliado os efeitos de agentes biológicos e mecânicos sobre o reparo ósseo (MALIZOS et al., 2006). Baseado na descoberta de duas propriedades ósseas importantes na consolidação óssea, a osteoindução e a piezoeletricidade, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de avaliar o efeito e o mecanismo de ação da estimulação por agentes químicos e mecânicos.

2.2 Osteoindução

Em 1965, o Dr. Marshall Urist, estudando os processos que determinavam a neoformação óssea, deduziu que este processo era determinado pela presença de um fator central. Este fator foi relatado como uma substância indutora de formação óssea, presente na matriz do osso (SANTOS et al., 2005), e foi por ele chamada pela primeira vez, de proteína morfogenética óssea. A propriedade de osteoindução foi designada para um princípio fundamental da regeneração óssea, desencadeado pela ação das proteínas morfogenéticas ósseas (URIST, 1965; URIST e STRATES, 1971).

2.3 Piezoeletricidade

A piezoeletricidade é a polarização elétrica produzida por alguns materiais quando submetidos a deformação mecânica. O primeiro relato das propriedades piezoelétricas do osso foi feito por Fukada e Yasuda (1957), que, em seu estudo constataram que sob ação de uma força mecânica, o osso foi capaz de transformá-la em energia elétrica, alterando o potencial elétrico das células ósseas. Devido a isto, observou-se que certos tecidos biológicos têm alguma forma de reação elétrica sob tensão mecânica (LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005)

2.4 Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade no tecido ósseo

O ultrassom é uma forma de energia mecânica que se propaga por ondas acústicas de alta frequência. Ao serem transmitidas para o interior do corpo, as ondas promovem microdeformações na região óssea estimulada e são capazes de gerar estímulos para acelerar o processo osteogênico (CARVALHO et al., 2001). O ultrassom pode ser empregado para fins terapêuticos, diagnósticos ou em procedimentos cirúrgicos, variando tão somente a intensidade utilizada (MORAES, 2006). Para fins terapêuticos, a intensidade varia de 1 a 3 W/cm², sendo empregado para diminuir rigidez articular, dores e espasmos musculares. Para procedimentos de litotripsia e catarata, a intensidade utilizada varia entre 5 a 300W/cm². E por fim, a intensidade do ultrassom utilizado para diagnósticos varia entre 1 a 50W/cm² (RUBIN et al., 2001; SOUSA, 2003).

Em 1950, a relação entre ultrassom de alta intensidade e a consolidação óssea foi investigada pela primeira vez (MAINTZ, 1950). A partir daí, alguns pesquisadores realizaram experimentos com modelos animais, e concluíram que a utilização de ultrassom de alta intensidade (5000 a 25.000 mW/cm²) tinha efeitos deletérios na consolidação óssea (necrose, reabsorção óssea, aumento da formação de tecido fibroso e aumento do tempo consolidação) (ARDEN et al., 1957; BENDER et al., 1954; HERRICK et al., 1956). Contrariando estes achados, outros estudos demonstraram que a utilização de ultrassom de média intensidade (200 a 3.000mW/cm²) aumentou a formação de calo ósseo e diminuiu o tempo de consolidação do defeito ósseo do rádio (DE NUNNO, 1952; CORRADI e COZZOLINO, 1953) e tíbia de coelhos (KLUG et al., 1986) em relação aos animais que não receberam o tratamento. Devido a grande variação dos resultados sobre a utilização do ultrassom de alta intensidade na consolidação óssea, muitos pesquisadores fizeram algumas modificações na administração do ultrassom: alguns movimentavam o transdutor em forma de pulsos, outros alteraram a fonte do ultrassom para pulsado e outros ainda reduziram a potência do gerador ultrassônico (CLAES e WILLIE, 2007). Duarte (1983) realizou um estudo no qual

conseguiu reduzir o tempo da consolidação óssea utilizando o aparelho de ultrassom pulsado com apenas 30mW/cm^2 , ou seja, sob baixa intensidade. Recentemente várias publicações têm documentado o sucesso do uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade para acelerar o processo de consolidação (HECKMAN et. al., 1994; KRISTIANSEN et al., 1997) e no tratamento de não-união óssea (CHOFFIE e DUARTE, 1994¹; MAYR et al., 2000, MORAES, 2006).

Um estudo estatístico demonstrou que, dentre os estudos selecionados, houve redução significativa do tempo de consolidação dos grupos experimentais (tratados com ultrassom pulsado de baixa intensidade) em relação aos grupos controles, redução média que equivale a aproximadamente a 64 dias no tempo de consolidação (BUSSE et al., 2002).

Baseado nos resultados positivos de diversos estudos, em outubro de 1994 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou a utilização do ultrassom pulsado de baixa intensidade no tratamento não invasivo de fraturas recentes. Posteriormente, em fevereiro de 1998 a aprovação se estendeu também para o tratamento não invasivo da não-união óssea (MORAES, 2006).

2.4.1 Mecanismos de interação do ultrassom de baixa intensidade na consolidação óssea

O processo natural de reparo da fratura começa quando os restos celulares e coágulos são removidos por macrófagos, e há proliferação do endóstio e perióstio próximo ao foco da fratura, dando origem inicialmente ao colar conjuntivo que progressivamente se transforma em calo ósseo (LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005). A descarga de estímulos mecânicos determina remodelação deste calo ósseo, fazendo com que seja reabsorvido por osteoclastos e substituído por tecido ósseo lamelar formado por osteoblastos (GERLANC, 1975).

¹ Apresentado em : **Orthopaedic Health Conference**, São Paulo, Brasil, 15 de junho de 1994 CHOFFIE, M.; DUARTE, L.R. Low intensity pulsed ultrasound and effects on ununited fractures.

Segundo Duarte (1983), o ultrassom pulsado atinge o tecido ósseo por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em sinal elétrico como resposta do osso (efeito piezoelétrico). Daí por diante, o processo de formação do osso é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente (LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005). No entanto, o mecanismo de interação do ultrassom com o tecido ósseo ainda é alvo de especulação científica, pois há autores que afirmam que o ultrassom possa exercer uma força mecânica nas células dos tecidos moles no local da fratura (TAKIKAWA, 2001), ou que as ondas de pressão geradas pelo ultrassom possam mediar a atividade biológica, diretamente pela deformação mecânica da membrana celular ou, indiretamente pelo efeito elétrico causado por esta deformação (HECKMAN et. al., 1994).

Vários estudos demonstraram o aumento da expressão de alguns agentes biológicos envolvidos na consolidação do osso, como os fatores do crescimento (REHER et al., 1999; NARUSE et al., 2000; TAKIKAWA et al., 2001; NARUSE et al., 2003). O estudo de Sant'anna et al. (2005) concluiu que a utilização do ultrassom (1,5MHz, 30mW/cm²) estimula a diferenciação osteogênica das células ósseas não apenas pelo aumento da secreção dos fatores de crescimento mas também, sensibilizando as células à ação dos fatores de crescimento. Em relação aos efeitos mecânicos, Behari e Singh (1981) demonstraram que sob estimulação óssea por ultrassom de 3,83mW/cm² houve formação de potencial elétrico de 64μV. Klug e Knoch (1986) demonstraram que sob estimulação óssea por energia ultrassônica de 800kHz e 0,5 W/ cm² houve aumento do potencial elétrico do local da fratura em 0,5mV. O dado obtido por Duarte (1983) na estimulação óssea com ultrassom de 57mW/ cm², foi a geração de um potencial piezoelétrico de 1,5mV.

2.4.2 Efeitos térmicos do ultrassom pulsado de baixa intensidade

A habilidade do ultrassom pulsado de baixa intensidade em estimular alterações celulares e teciduais pode estar correlacionada o aumento da temperatura associada à absorção de energia (WU e DU, 1990; CHANG et al., 2002). Os efeitos térmicos da utilização do ultrassom sob intensidades altas (1000 a 3000W/cm²) podem ser intensos. Chang et al. (2002) constataram que, sob estímulo ultra-sônico de intensidade entre 20 a 50 mW/cm² o aumento da temperatura era inferior a 1°C. Na utilização do ultrassom pulsado de baixa intensidade (50mW/cm², 15 minutos por dia), Duarte (1983) observou aumento desprezível da temperatura local, da ordem de 0,01°C +/- 0,005°C. Contudo, algumas enzimas são sensíveis a mínimas alterações térmicas (WELGUS, et al., 1981).

2.4.3. Efeitos não térmicos do ultrassom pulsado de baixa intensidade

As alterações observadas em tecidos e células decorrentes do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade podem estar associadas a processos não térmicos como a cavitação e corrente acústica (DYSON,1982).

A cavitação é caracterizada como a formação de pequenas bolhas gasosas resultantes da vibração do ultrassom. A cavitação estável ocorre quando as bolhas oscilam de um lado para o outro dentro das ondas de pressão do ultrassom e, contudo permanecem intactas. A cavitação transitória (ou colapso) ocorre quando o volume da bolha se altera rapidamente e então colapsa (implode), causando alta pressão e mudanças da temperatura, sendo potencialmente lesiva para os tecidos. A cavitação estável é considerada de valor terapêutico. A pulsação reduz os riscos de dano por cavitação (LOW e REED, 2001)

As correntes acústicas são caracterizadas como fluxo circulatório constante decorrente do torque da radiação. Além disso, como resultado de algum tipo de cavitação, ocorre a movimentação localizada e unidirecional de líquido em torno da

bolha que está vibrando. Esses movimentos muito pequenos de líquido também ocorrem em torno das células, fibras de tecidos e outras interfaces como, por exemplo, a óssea (LOW e REED, 2001). Isso pode alterar a taxa de infusão de íons, ocasionando alterações terapêuticas úteis, que incluem aumento da secreção dos mastócitos (FYFE e CHAHL, 1982), aumento da captação de cálcio (MORTIMER e DYSON, 1988) e maior produção do fator de crescimento pelos macrófagos (YOUNG e DYSON, 1990). Entretanto, o fenômeno da cavitação nunca foi adequadamente confirmado nos tecidos (CLAES e WILLIE, 2007).

Outros efeitos não-térmicos do ultrassom pulsado de baixa intensidade estão relacionados ao efeito piezoelétrico, já discutido anteriormente.

2.5. Proteína morfogenética óssea (BMP)

Em 1965, o Dr. Marshal Urist revolucionou os conceitos sobre a consolidação óssea, sugerindo a hipótese da existência das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) na matriz colágena do osso (URIST, 1965; URIST et al., 1994). O termo osteoindução foi designado para o princípio fundamental da regeneração óssea desencadeado pelas proteínas morfogenéticas ósseas (URIST, 1965; URIST e STRATES, 1971).

As proteínas morfogenéticas ósseas fazem parte da superfamília do fator do crescimento transformador beta (TGF- β), que inclui a subfamília baseada em suas sequências de aminoácidos (SANTOS et. al., 2005). Estas proteínas são caracterizadas como agentes reguladores de diversas respostas celulares entre elas: quimiotaxia celular, mitose de células progenitoras ósseas, calcificação cartilaginosa e remodelamento ósseo (FRANCESCHI, 1999; NISHIDA et al., 2000; REDDI, 2000).

Em 1998, Einhorn descreveu diversos eventos celulares da consolidação óssea utilizando ratos como modelo de estudo, onde demonstra que já nas primeiras 24 horas após a fratura há expressão de BMPs pelas células mesenquimais. A sequência genética das BMPs foi identificada por Wozney et al. em 1988, e desde

então já foram descobertas mais de 40 tipos de proteínas morfogenéticas ósseas. Contudo, sabe-se hoje que, durante a consolidação óssea, a expressão de diferentes tipos de BMP segue uma sequência cronológica. A expressão da BMP-2 e BMP-4 ocorre precocemente pelas células mesenquimais, já a expressão da BMP-7 se firma durante fases mais tardias, aproximadamente entre duas a quatro semanas após a lesão óssea (PHILLIPS, 2005).

Alguns autores acreditam que um dos fatores contribuintes para a instalação da condição de não-união ou retardo da consolidação óssea seja a quantidade deficitária de proteínas morfogenéticas ósseas e/ou de seus receptores no sítio da fratura, bem como a expressão majoritária dos inibidores de BMPs (SAKOU, 1998; SCHMITT et al., 1999; MEYER et al., 2001). Em um estudo conduzido por Einhorn et al. (2003), que utilizou ratos como modelo experimental, demonstrou que uma única aplicação transcutânea de BMP no sítio da fratura foi responsável pelo aumento da resistência biomecânica bem como pela redução do tempo de consolidação óssea.

Baseado nos resultados bem sucedidos de diversos estudos, foram aprovadas as utilizações da BMP-2 e da BMP-7 como tratamento adjunto da consolidação óssea (WESTERHUIS et al., 2005), sendo recomendada a utilização da BMP-2 em fraturas recentes, e BMP-7 em casos de consolidação óssea complicada (VAIBHAV et al., 2007). Embora a utilização das BMPs tenha se mostrado efetiva como tratamento adjunto das consolidações ósseas, ainda não existe padronização da dosagem. Esta variação fica evidente quando se compara o estudo realizado por Geesink et al. (1999) e Friedlaender et al. (2001), onde foi utilizada a dose de 2,5mg e 3,5mg, respectivamente, ambos realizados em seres humanos.

Outro fato importante é a origem da proteína morfogenética óssea. Em 1979, Urist et al. demonstraram que, por meio de reações bioquímicas, era possível extrair proteínas morfogenéticas ósseas da matriz óssea de animais. Graças aos avanços da medicina molecular, foi possível viabilizar a utilização destas proteínas em humanos, quando então se desenvolveram as proteínas morfogenéticas ósseas recombinantes humanas (rhBMP). Embora o desenvolvimento destas proteínas

visse a redução do risco de rejeição da BMP em humanos, Edwards III et al. (2004) não relataram qualquer reação adversa na aplicação de rhBMP-2 em defeito ósseo tibial de cães.

Para Toriumi e Robertson (1993), um dos fatores mais importantes que podem determinar o sucesso ou o fracasso de enxertos ósseos indutores (BMP) é a eficiência do material carreador.

2.5.1 Carreador

Embora já tenha sido demonstrado que a aplicação de BMP em meio tampão promova a aceleração do processo de consolidação óssea, a utilização de outros veículos é capaz de aumentar o efeito terapêutico da BMP na consolidação óssea (SEEHERMAN et al., 2002; ULUDAG et al., 2000)

O carreador ideal deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e assegurar distribuição uniforme sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do sítio. O carreador deve ser absorvido na medida em que for ocorrendo a formação óssea. Além disso deve ser seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanhos e formas adequadas para o enxerto (SANTOS et al., 2005).

O estudo experimental conduzido por Edwards III et al. (2004) utilizou a pasta de fosfato de cálcio como veículo carreador da rhBMP-2, aplicada por via transcutânea no local da fratura. As mais importantes categorias de carreadores para BMP incluem os polímeros naturais como o colágeno, materiais inorgânicos (cimento de fosfato de cálcio), polímeros sintéticos (ácido polilático, ácido poliglicólico) e compostos (polímeros naturais com grânulos de ortofosfato de cálcio) (VAIBHAV et al., 2007). Em seu estudo recente, Takahashi et al. (2007) demonstraram que a atividade de osteoindução foi maior na utilização de BMP-2 incorporada a um hidrogel e aplicada em defeitos ósseos do crânio de primatas, comparada a veiculação da BMP-2 em matriz óssea não solúvel. Diversos carreadores em gel têm sido desenvolvidos, pois apresentam vantagens

significativas em relação àqueles com formato rígido. Os carreadores em gel dispensam procedimentos cirúrgicos para sua aplicação, são capazes de manter a liberação controlada do fármaco por longo período, são absorvíveis e são capazes de preencher todo o local de infiltração. Porém, mesmo em gel, alguns carreadores como o óxido de polietileno, fibrina e colágeno podem desencadear reações imunológicas no hospedeiro, penetração inadequada no sítio, e variações na degradação do material (PARK et al., 2005).

2.5.1.1 Gel de quitosana

A quitosana é um copolímero derivado da quitina, material orgânico abundante presente no exoesqueleto de crustáceos, moluscos, insetos e até mesmo na parede celular de alguns fungos (EUGENE; LEE, 2003). A quitosana é um polissacarídeo linear composto por unidades de glucosamina e N-acetil glucosamina (KIM et al., 2008) proveniente da reação de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (TONHI e PLEPIS, 2002). Todas as propriedades físico-químicas apresentadas pela quitosana (solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólítico e outros) dependem do seu grau de desacetilação (GD) e da distribuição de cargas elétricas ao longo da cadeia. O uso da quitosana como biomaterial é baseado nas suas inúmeras propriedades biológicas, que são: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, aceleração do processo de formação de osteoblastos (responsáveis pela formação do osso), hemostático, além de acelerar o processo de cicatrização de feridas. A cinética de biodegradação da quitosana é mais lenta em comparação a outros polímeros biocompatíveis (por exemplo, colágeno), devido ao fato de não existir nenhuma atividade enzimática nos mamíferos direcionada a degradação da quitosana, fato este que a torna um biomaterial que corrobora todos os requisitos essenciais para um carreador de moléculas bioativas (LÓPEZ-LACOMBA et al., 2006).

A quitosana tem inúmeras aplicações dependendo da sua forma física. A forma em gel é a mais indicada para veiculação controlada de agentes bioativos. López-Lacomba et al. (2006) demonstraram que a atividade da BMP se manteve constante durante longo período de tempo quando veiculada em meio a um carreador constituído por quitosana.

2.6 Interação entre ultrassom pulsado de baixa intensidade e proteína morfogenética óssea

Recentemente, Sant'anna et al. (2005) avaliaram a expressão de diversos genes associados a consolidação óssea, por meio do estudo comparativo dos efeitos da utilização do ultrassom pulsado de baixa intensidade e da proteína morfogenética óssea-2 recombinante humana (rhBMP-2) sobre uma cultura de células estromais de fêmures de ratos. Estas culturas de célula, foram submetidas a exposição do ultrassom (1,5MHz, 30mW/cm²) ou a rhBMP-2 (10ng/mL) ou a combinação destes dois agentes. Por meio da análise de PCR (reação em cadeia pela polimerase), determinou-se os efeitos deste tratamento na expressão de vários genes, que sabidamente orquestram diversos eventos da consolidação óssea. Os resultados demonstraram aumento na expressão gênica das células expostas ao ultrassom pulsado de baixa intensidade, bem como na exposição da rhBMP-2, porém não houve efeito sinérgico ou aditivo entre o ultrassom e a rhBMP-2 (SANT'ANNA et al., 2005).

Inúmeros estudos têm avaliado os efeitos da utilização de ultrassom pulsado de baixa intensidade e das proteínas morfogenéticas na consolidação óssea de animais e seres humanos. Contudo, há variação de métodos de avaliação empregados na avaliação dos resultados obtidos em cada estudo. O exame radiográfico é o mais comumente empregado na avaliação da regeneração óssea em modelos in vivo. O Quadro 1 apresenta alguns métodos eleitos para avaliação dos resultados experimentais in vivo.

Quadro 1 - Diferentes estudos sobre regeneração óssea, identificando a espécie e tipos de avaliações empregados em cada

Autores	Espécie	Agente	Avaliações
DUARTE, 1983	Coelhos	Ultrassom pulsado de baixa intensidade	Avaliação radiográfica, exame histológico
BOUXSEIN et al., 2001	Coelhos	rhBMP-2	Avaliação radiográfica, cintilografia óssea e teste biomecânico
TAKIKAWA et al., 2001	Ratos	Ultrassom pulsado de baixa intensidade	Avaliação histomorfométrica óssea, radiográfica e tomografia
YANG e PARK, 2001	Cães	Ultrassom pulsado de baixa intensidade	Avaliação clínica e radiográfica
EDWARDS III et al., 2004	Cães	RhBMP-2	Avaliação radiográfica, histológica, placa de força e teste mecânico do osso
ECKARDT, et al. 2005	Humanos	rhBMP-2	Avaliação clínica, radiográfica e teste biomecânico
GIANNOUDIS e TZIOUPIS, 2005	Humanos	BMP-7	Avaliação clínica e radiográfica
LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005	Ratos	Ultrassom pulsado de baixa intensidade	Avaliação histomorfométrica óssea e teste mecânico do osso
CALORI et al., 2006	Humanos	BMP	Avaliação clínica e radiográfica
JONES et al., 2006	Cães	RhBMP-2	Avaliação radiográfica
MORAES, 2006	Coelhos	Ultrassom pulsado de baixa intensidade	Avaliação clínica, radiográfica e histológica

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral realização de um estudo comparativo dos efeitos da emprego do ultrassom pulsado de baixa intensidade e a proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) sobre a consolidação do osso *in vivo*. Para tanto foram realizadas análise qualitativa (avaliação clínica e radiográfica) e quantitativa (histomorfometria óssea e bioquímica) do defeito ósseo em rádio de coelhos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Comparar a eficácia da rhBMP-2 e do ultrassom pulsado de baixa intensidade na consolidação óssea;
2. Avaliar o efeito da quitosana como carreador da rhBMP-2, possibilitando a sua ação na consolidação óssea;
3. Comparar o tempo de consolidação óssea nos diferentes tratamentos testados;
4. Comparar os resultados histomorfométricos dos ossos expostos aos diferentes tratamentos.
5. Comparar os valores bioquímicos (marcadores ósseos) dos diferentes tipos de tratamentos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Como modelo experimental utilizou-se de 24 coelhos da raça Nova Zelândia branco (*Oryctolagus cuniculus*), adultos jovens, machos, com peso médio de 3,8kg \pm 0,6; mantidos em gaiolas individuais alimentados com água potável e ração² apropriada *ad libitum*. Os coelhos foram mantidos no setor de Cunicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, em gaiolas individuais de dimensões de 80 cm x 50 cm x 35 cm. O tempo médio de exposição luminosa diária era de 12 horas.

4.2 Montagem dos grupos

Realizou-se ostectomia parcial dos rádios direito e esquerdo de cada coelho para realizar a observação experimental e controle. O rádio do coelho foi eleito como sítio experimental, pois possui características importantes para o procedimento cirúrgico: sua diáfise é cilíndrica e apresenta-se superficialmente na face anterior do antebraço, facilitando o acesso cirúrgico com poucos danos a musculatura, vasos e nervos adjacentes. Além disso, a existência de uma forte membrana interóssea que une o rádio e a ulna possibilita a realização da ostectomia parcial dispensando o uso de fixadores ósseos (CARRO, 1998; MORAES, 2006). Diversos estudos utilizam ambos os membros do mesmo animal para avaliação dos efeitos regenerativos do ultrassom pulsado de baixa intensidade e das proteínas morfogenéticas ósseas, não havendo ação do tratamento local em outro sítio distante. As atividades experimentais realizadas compreendem os grupos discutidos no quadro 2:

² Ração para coelhos, Cargill Nutrição Animal (**Purina**/Nestlé), São Paulo- SP

Quadro 2 - Descrição dos tratamentos específicos de cada grupo experimental.

Grupo (coelhos)	Tratamento
GI (coelhos 1, 2, 3 e 4)	Sem tratamento
GII (coelhos 5, 6, 7 e 8)	Ultrassom
GIII (coelhos 9, 10, 11 e 12)	Gel de quitosana
GIV (coelhos 13, 14, 15 e 16)	Gel de quitosana e ultrassom
GV (coelhos 17, 18, 19 e 20)	Gel de quitosana ativado com rhBMP-2
GVI (coelhos 21, 22, 23 e 24)	Gel de quitosana ativado com rhBMP-2 e ultrassom

rhBMP-2: proteína morfogenética óssea recombinante humana 2

4.2.1 Grupos experimentais e controle

A falha óssea (ostectomia parcial) foi realizada em ambos os rádios dos 24 coelhos.

Grupo I (GI). Controle: Após a confecção do defeito ósseo, a síntese da pele seguiu os padrões de rotina. Foi feita administração simulada de ultrassom (sem emissão de energia ultrassônica) durante dez minutos em cada foco de ostectomia, uma vez ao dia por dez dias, iniciando logo após o término do procedimento cirúrgico. Dois animais (coelho 1 e 2) foram eutanasiados no trigésimo dia, e outros dois (coelhos 3 e 4) no quadragésimo quinto dia do pós-cirúrgico.

Grupo II (GII). Seguindo os padrões de rotina, a pele foi suturada logo após a confecção do defeito ósseo. A administração do ultrassom pulsado de baixa intensidade ($30\text{mW}/\text{cm}^2$, 1,5MHz) foi realizada durante dez minutos em cada foco de ostectomia, uma vez ao dia por dez dias. Dois animais foram eutanasiados no trigésimo dia (coelhos 5 e 6), e outros dois no quadragésimo quinto dia do pós-cirúrgico (coelhos 7 e 8).

Grupo III (GIII). Após a confecção do defeito ósseo, ainda durante o transcirúrgico, adicionou-se 1mL do gel de quitosana. A administração simulada de

ultrassom (sem emissão de energia ultrassônica) foi feita durante dez minutos em cada foco de ostectomia, uma vez ao dia por dez dias, iniciando logo após o término do procedimento cirúrgico. Dois animais foram eutanasiados no trigésimo dia (coelhos 9 e 10), e outros dois no quadragésimo quinto dia do pós-cirúrgico (coelhos 11 e 12).

Grupo IV (GIV). Após a confecção do defeito ósseo, ainda durante o transcirúrgico, adicionou-se 1mL do gel de quitosana no local da falha óssea. A administração com ultrassom pulsado de baixa intensidade ($30\text{mW}/\text{cm}^2$, 1,5MHz) foi feita durante dez minutos em cada foco de ostectomia, uma vez ao dia por 10 dias, iniciando logo após o término do procedimento cirúrgico dez dias. Dois animais foram eutanasiados no trigésimo dia (coelhos 13 e 14), e outros dois no quadragésimo quinto dia do pós-cirúrgico (coelhos 15 e 16).

Grupo V (GV). Após a confecção do defeito ósseo, ainda durante o transcirúrgico, adicionou-se 1mL do gel de quitosana ativado com rhBMP-2. A administração simulada de ultrassom (sem emissão de energia ultrassônica) foi feita durante dez minutos em cada foco de ostectomia, uma vez ao dia por dez dias, iniciando logo após o término do procedimento cirúrgico. Dois animais foram eutanasiados no trigésimo dia (coelhos 17 e 18), e outros dois no quadragésimo quinto dia do pós-cirúrgico (coelhos 19 e 20).

Grupo VI (GVI). Após a confecção do defeito ósseo, ainda durante o transcirúrgico, adicionou-se 1mL do gel de quitosana ativado com rhBMP-2. A administração com ultrassom pulsado de baixa intensidade ($30\text{mW}/\text{cm}^2$, 1,5MHz) foi feita durante durante dez minutos em cada foco de ostectomia, uma vez ao dia por dez dias, iniciando logo após o término do procedimento cirúrgico. Dois animais foram eutanasiados no trigésimo dia (coelhos 21 e 22), e outros dois no quadragésimo quinto dia do pós-cirúrgico (coelhos 23 e 24).

A exposição simulada ao ultrassom de baixa intensidade se baseia na utilização do mesmo equipamento e procedimentos adotados para o grupo a ser tratado, porém sem emissão de energia ultrassônica. Esta técnica garante que todos os animais sejam rigorosamente submetidos às mesmas condições

experimentais e de manipulação, com exceção apenas do estímulo ultra-sônico. Esta técnica é internacionalmente conhecida como “Mock-insonation” (PIZZARELLO et al., 1978).

4.3. Procedimento Cirúrgico e Eutanásia

Os animais não foram submetidos a jejum alimentar e hídrico, visto que tal procedimento não é necessário, pois os coelhos raramente apresentam emese (FLECKNELL et al., 2007). Como medicação pré-anestésica administrou-se acepromazina³ na dose de 1mg/kg por via intra-muscular. Após quinze minutos administrou-se pela mesma via, cetamina⁴ na dose de 40mg/kg. Em seguida foram submetidos a anestesia inalatória com halotano⁵ diluído em oxigênio a 100%, por meio de máscara naso-oral vedada, sendo intubados com sonda de Magill após a perda do reflexo laringotraqueal. Para reduzir o consumo de anestésico volátil e evitar a percepção do estímulo nociceptivo, foi feito bloqueio do plexo braquial com cloridrato de lidocaína⁶ na dose total de 7mg/kg.

Ambos os membros torácicos de cada coelho foram tricotomizados e preparados para a cirurgia. Foi feita incisão longitudinal na face crânio-medial sobre o rádio do membro torácico direito e esquerdo. Ato contínuo, incisão da pele e tecido cutâneo, seguido da divulsão da musculatura local, até alcançar o periósteo. Em seguida, já com a diáfise do rádio exposta (Figura 1), confeccionou-se o defeito ósseo perpendicular ao eixo longitudinal do terço médio do rádio direito e esquerdo, tendo aproximadamente 0,5cm por meio da utilização da serra óssea⁷. Para padronização das dimensões da falha óssea utilizou-se a extremidade de uma pinça Allis como guia, que corresponde exatamente a 0,5cm de comprimento (Figura 2 e 3).

³ Acepran 1% - Univet, São Paulo, SP

⁴ Cetamin 10% - Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP

⁵ Tanohalo – Cristália, Campinas SP

⁶ Xylestesin 2% - Cristália Campinas, SP

⁷ Serra óssea autoclavável - KALMEDICA – Campinas -SP

Não foi empregado no tratamento pós-operatório fármacos com princípios anti-inflamatórios, a fim de evitar qualquer alteração nos resultados experimentais. O tratamento pós-operatório baseou-se na administração de cloridrato de tramadol⁸ (4mg/kg, a cada 12 horas, por via subcutânea, durante 3 dias) e curativo tópico diário até remoção dos pontos (7 dias).

A antibioticoterapia baseou-se na administração de produto contendo associação de penicilinas e estreptomicina (50.000UI/kg)⁹ por via intramuscular previamente ao procedimento cirúrgico e no segundo dia do período pós-operatório.

Ao final de trinta ou quarenta e cinco dias, dois coelhos de cada grupo foram sacrificados. Para tanto utilizou-se propofol¹⁰ na dose de 25mg/kg por via intravenosa após introdução de cateter¹¹ na veia marginal da orelha, para evitar qualquer tipo de desconforto ao animal. Na ausência de reflexos e sons respiratórios, foi administrado altas doses de cloreto de potássio por via intravenosa e intra-cardíaca, até constatação clínica de óbito. Todos os procedimentos nos animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA), da UNESP/FCAVJ, protocolo n° 022497-07.

⁸ Tramadon - Cristália, Campinas, SP

⁹ Multibiótico Reforçado – Vialfarma, São Sebastião do Paraíso, MG

¹⁰ Propovan – Cristália, Campinas -SP

¹¹ Cateter BD Angiocath 22 – Becton, Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda – Juiz de Fora, MG



Figura 1 - Imagem fotográfica do período trans-operatório demonstrando o acesso crânio-medial com exposição do rádio (seta) para posterior confecção da falha óssea.



Figura 2 - Imagem fotográfica do período trans-operatório. A extremidade da pinça Allis, foi utilizada para demarcar os limites proximal e distal para posterior confecção da falha óssea (traços amarelos).



Figura 3 - Imagem fotográfica do período trans-operatório. Note que a dimensão da falha óssea corresponde às dimensões da extremidade da pinça Allis (setas amarelas)

4.4. Gel de quitosana e rhBMP-2

4.4.1. Preparação do gel de quitosana

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, encontrado principalmente no exoesqueleto de insetos e nas carapaças de crustáceos. Pode ser encontrada na parede celular de algumas espécies de fungos, porém sua maior fonte de obtenção é através da desacetilação da quitina (KIM, 2008).

A desacetilação da quitina geralmente é feita reagindo-a com uma base (hidróxido de sódio-NaOH ou de potássio-KOH), e a extensão da desacetilação varia com as condições usadas na reação. As preparações comerciais têm graus de desacetilação variando entre 50-90% (baixo, médio e alto peso molecular).

Para a preparação do gel foi utilizada a quitosana¹² de alto peso molecular (Mw ~100,000) e grau de desacetilação superior a 75%.

¹² Sigma-Aldrich – St. Louis, Missouri -EUA

Inicialmente, preparou-se uma solução de quitosana 1,5% em peso, através da dissolução da mesma em solução aquosa de ácido acético 1% (solvente), sob agitação constante e à temperatura ambiente.

Para a formação do gel, adicionou-se, à solução de quitosana, um polímero de carga negativa, em quantidade suficiente para a gelificação. Neste caso, a formação do gel se deu pela coacervação complexa, induzida através da criação de forças eletrostáticas entre as macromoléculas, que possuem cargas opostas.

Para o processo de esterilização do gel de quitosana, utilizou-se pastilhas de paraformaldeído¹³ a 3% a 50°C durante 4 horas.

Este experimento visou analisar a liberação controlada da proteína morfogenética óssea recombinante humana-2 (rhBMP-2) no gel de quitosana. Para isso, a proteína foi distribuída uniformemente no gel, de modo que sua concentração fosse de 1µg de rhBMP-2/100uL de gel. Portanto, para administração de 10µg da proteína no local do defeito ósseo, foi administrado 1000µL do gel ativado com a proteína morfogenética óssea.

Os coelhos dos grupos GIII, GIV, GV e GVI receberam o gel de quitosana no local da falha óssea, porém apenas os grupos GV e GVI receberam o gel ativado com a proteína.

4.4.2. Proteína morfogenética óssea

A proteína morfogenética óssea é obtida por meio de técnicas de engenharia genética que utiliza o sistema de expressão bacteriana da *Escherichia coli*, e o processo de purificação, por meio da cromatografia sequencial.

A apresentação comercial da rhBMP-2¹⁴ utilizada neste experimento era liofilizada com concentração de 1mg/mL em 20mM de citrato de sódio, pH 4, grau de pureza de 95% e peso molecular de 26kDa. Para reconstituição e diluição da proteína, seguiu-se as recomendações do fabricante.

¹³ Rioquímica - São José do Rio Preto - SP

¹⁴ Invitrogen – Carlsbad, California -EUA

4.5. Ultrassom pulsado de baixa intensidade

Foi utilizado o ultrassom pulsado de baixa intensidade (Figura 4) projetado e montado no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) –S.P. O aparelho de ultrassom nº018036781 possui as seguintes características técnicas :

- Transdutor de cerâmica piezoelétrica (PZT)
- Largura do pulso de repetição de 200us
- Frequência de 1,5MHz
- Potência (dosimetria 22/11/2007) 114mW
- Intensidade (22/11/2007) 30mW/cm²



Figura 4 - Imagem fotográfica do aparelho de ultrassom pulsado de baixa intensidade, cedido gentilmente pelo Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia, da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (USP).

Para garantir adequada estimulação ultrassônica do sítio ósseo, foi feita aplicação de gel¹⁵ de contato entre o transdutor e a pele. O transdutor foi mantido sobre o local da osteotomia, não sendo feito qualquer movimentação deste (figura 5).



Figura 5 - Imagem fotográfica representando a aplicação do ultrassom de baixa intensidade sobre o local da falha óssea radial.

Durante os dez dias de aplicação do ultrassom pulsado de baixa intensidade não se utilizou qualquer método de contenção química.

4.6 Avaliação pós-operatória

4.6.1 Avaliação clínico-cirúrgica

Os coelhos foram observados diariamente até o momento da eutanásia, a fim de se verificar qualquer reação tecidual na cicatriz cirúrgica e eventual claudicação no decorrer do tempo de avaliação.

¹⁵ Gel para acoplamento ultrassônico –ECG Carci Ind. e Com. de Apar. Cirúrgicos e Ortopédicos Ltda, São Paulo-SP

4.6.2 Avaliação radiográfica

Todos os animais tiveram os membros torácicos (direito e esquerdo) radiografados no pós-operatório imediato, décimo quinto e trigésimo dia. Aqueles que foram sacrificados apenas no quadragésimo quinto dia, tiveram os membros torácicos (direito e esquerdo) radiografados também no dia 45. A classificação radiográfica teve como base o sistema de escalas Lane e Sandhu (1987), apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 - Descrição dos parâmetros de formação óssea segundo o sistema de escala de Lane e Sandhu (1987).

Formação óssea	Score
Sem evidência de formação óssea	0
Formação óssea ocupando 25% da falha óssea	1
Formação óssea ocupando 50% da falha óssea	2
Formação óssea ocupando 75% da falha óssea	3
Falha óssea completamente preenchida	4

Para padronização do exame radiográfico utilizou-se as projeções crânio-caudal e médio-lateral de ambos os membros torácicos. Desta forma é possível afirmar se o crescimento ósseo ocorre no centro da falha ou lateral a ela. A técnica radiográfica empregada foi de 37 kV, 200mA e 4,0mAs. A realização dos exames radiográficos foi realizado no Setor de Radiologia, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, S.P. Neste setor o aparelho de raios-X é o de modelo Tridoros 912 E¹⁶ com mesa teleciclógrafa com capacidade para 800mA, equipada com grade anti-difusora Potter-Bucky. Utilizou-se os filmes radiográficos T-Mat G/RA¹⁷ montados em chassi metálico com par de écrans intensificador Laux Regular¹⁸. A revelação e

¹⁶ Siemens -Alemanha

¹⁷ Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda

¹⁸ Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda

fixação dos filmes, identificados previamente por impressão luminosa com processador automático modelo X-OMAT 2000¹⁹.

4.6.3 Avaliação Histomorfométrica

Ao final de 30 e 45 dias, os coelhos foram eutanasiados. Os fragmentos ósseos no local da falha foram colhidos e fixados em formalina a 10% por, no mínimo quatro dias. Em seguida as amostras ósseas foram submetidas ao processo de descalcificação em solução de ácido fórmico a 30% e citrato de sódio a 20%.

Após a descalcificação, os fragmentos foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em Histosec²⁰ (parafina e resina plástica). Após a microtomia semi-seriada (intervalo de 50µm), os cortes histológicos com espessura de 5µm foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina e analisados em microscópio óptico.

Os parâmetros investigados foram [nomenclatura padronizada pela “American Society of Bone and Mineral Research” (PARFITT, 1988)]:

- Índice que expressa a formação óssea: Superfície Osteoblástica. Para determinar a superfície osteoblástica (SO), utilizou-se a lente de sobreposição traçada com linhas e pontos de intersecção acoplada a ocular com aumento de 20x e objetiva de 10x (RAFFI MENDÉZ, RIET-CORREA, 1997). Foram contados os pontos de intersecção que incidiram sobre a superfície osteoblástica, expressando o valor final em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula matemática:

$$SO = \frac{\text{Número intersecções que incidiram sobre os osteoblastos}}{\text{Número total de intersecções}} \times 100$$

- Índice que expressa quantidade de tecido ósseo: Volume trabecular. Para o cálculo do volume trabecular utilizou-se uma lente de sobreposição com 100

¹⁹ Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda

²⁰ Merck – Darmstadt, Alemanha.

pontos acoplados a ocular de 10X, utilizando objetiva de 20x (RAFFI, MENDÉZ, RIET-CORREA, 1997). Foram contados os pontos que incidiram sobre as trabéculas ósseas estabelecendo-se o valor em percentual, de acordo com a seguinte fórmula:

$$VTO = \frac{\text{Número pontos sobre trabéculas}}{\text{Número total de pontos}} \times 100$$

- Índice que expressa reabsorção óssea: Índice Osteoclástico. Para o cálculo deste índice, contaram-se todos os osteoclastos observados em determinada área (REVELL, 1983), sendo expresso como nº osteoclastos/mm² (PARFITT, 1988). Neste experimento a área para contagem foi de 321 x 240µm (0,08mm²). Para estas análises e fotodocumentação foi utilizado o microscópio Leica DM5000B acoplado ao software LAS- Leica Application Suite 2.5.1.. A preparação histológica das laminas, análises histológicas e morfométricas do osso foram realizadas no Departamento de Morfologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, S.P.

4.6.4 Mensuração da fosfatase alcalina sérica

Diferentes amostras de sangue foram colhidas nos tempos M0- tempo zero (imediatamente antes ao procedimento cirúrgico), M1, M2, M3 e M4 (7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, respectivamente). No caso dos animais que foram eutanasiados no quadragésimo quinto dia, realizou-se a colheita de sangue também nos tempo M5 e M6 (35 e 42 dias após o procedimento cirúrgico, respectivamente). Para colheita de sangue, introduziu-se uma agulha hipodérmica 25x0,80²¹ na veia marginal da orelha do coelho previamente contido em uma caixa de contenção. Por meio de gotejamento, colheu-se uma amostra de aproximadamente 2mL. O sangue foi centrifugado a 1.048,13G²² e o soro armazenado em tubo tipo Eppendorf²³, em seguida congelado a 20°C negativos

²¹ BD PrecisionGlide –Curitiba, PR

²² Centrífuga Excelsa Baby I206 –FANEM –São Paulo, SP

²³ tubo tipo Eppendorf- AlfaMaré- Instrum. Científicos Médicos Ltda – Uberaba, MG

para posterior análise. Com a finalidade de uniformizar as amostras de sangue e reduzir os efeitos do ciclo circadiano, elegeu-se o período da manhã (10h ao 12h) dos dias determinados para colheita de sangue.

Para mensuração dos valores séricos de fosfatase alcalina, empregou-se o sistema de determinação em modo cinético da fosfatase alcalina no soro²⁴, e um analisador semi-automático²⁵. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Campus de Jaboticabal, SP.

4.6.5 Análise estatística

Para estudo comparativo da eficácia da aplicação do agente físico (ultrassom pulsado de baixa intensidade) e bioquímico (proteína morfogenética óssea) sobre a consolidação óssea do rádio de coelhos, foi utilizado o delineamento experimental em parcelas subdivididas no membro torácico de cada coelho (avaliação morfométrica), subdivididas no tempo (análise fosfatase alcalina sérica) e no posicionamento (avaliação radiográfica); havendo para todas as análises seis grupos experimentais e quatro repetições.

Para realizar a análise estatística de cada perfil estudado (classificação radiográfica, mensuração da fosfatase alcalina sérica e parâmetros histomorfométricos), foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância a 5%.

Esta análise estatística foi efetuada pelo programa SAS²⁶, no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal- SP

²⁴ Fosfatase Alcalina Liquiform –Labtest, Lagoa Santa –MG

²⁵ fotocolorímetro semi-automático marca LabQuest - Lagoa Santa –MG

²⁶ SAS Institute Inc. SAS Online Doc® 9.1.3. SAS/STAT Cary, N.C., 2004

5 RESULTADOS

A seguir são apresentados na forma de itens, os resultados referentes à avaliação clínica pós-operatória, acompanhamento radiográfico, mensuração da fosfatase alcalina sérica e avaliação histomorfométrica óssea de todos os grupos experimentais deste estudo.

5.1. Avaliação Clínica pós-operatória

Não houve qualquer complicação cirúrgica ou anestésica durante o procedimento de confecção da falha óssea do radio direito e esquerdo dos coelhos de todos os grupos experimentais. Mesmo após a confecção da falha óssea bilateral, todos os coelhos apresentaram pouca dificuldade de movimentação, sendo relativamente mais notória nos três primeiros dias do período pós-operatório, quando receberam a administração do cloridrato de tramadol.

Não houve complicação da ferida cirúrgica durante todo o período de avaliação pós-operatória. No entanto, notou-se o aumento de volume de consistência macia na região da ostectomia nos coelhos do grupo experimentais que receberam o implante de gel de quitosana ativado ou não (GIII, GIV, GV e GVI).

Dispensou-se a utilização de contenção química tanto para a terapia com ultrassom pulsado de baixa intensidade quanto para cuidados tópicos da ferida cirúrgica. Apenas para o procedimento radiográfico utilizou-se a acepromazina (0,5mg/kg, via intramuscular) a fim de evitar qualquer lesão iatrogênica durante a manipulação e posicionamento do animal.

Todos os animais mantiveram o comportamento, ingestão de água e ração em níveis normais. Não houve qualquer alteração clínica digna de nota.

5.2. Avaliação radiográfica

Por meio das imagens radiográficas do pós-operatório imediato confirmou-se a regularidade e padronização dos sítios de todas as ostectomias.

Como esperado, os locais da falha óssea apresentaram-se totalmente radioluscentes até mesmo aqueles que receberam o gel de quitosana ativado ou não com a rhBMP-2 (Figura 6). Com o tempo pôde-se observar o aumento da radiopacidade no local da falha ou em suas adjacências, decorrente do processo ativo de consolidação óssea.

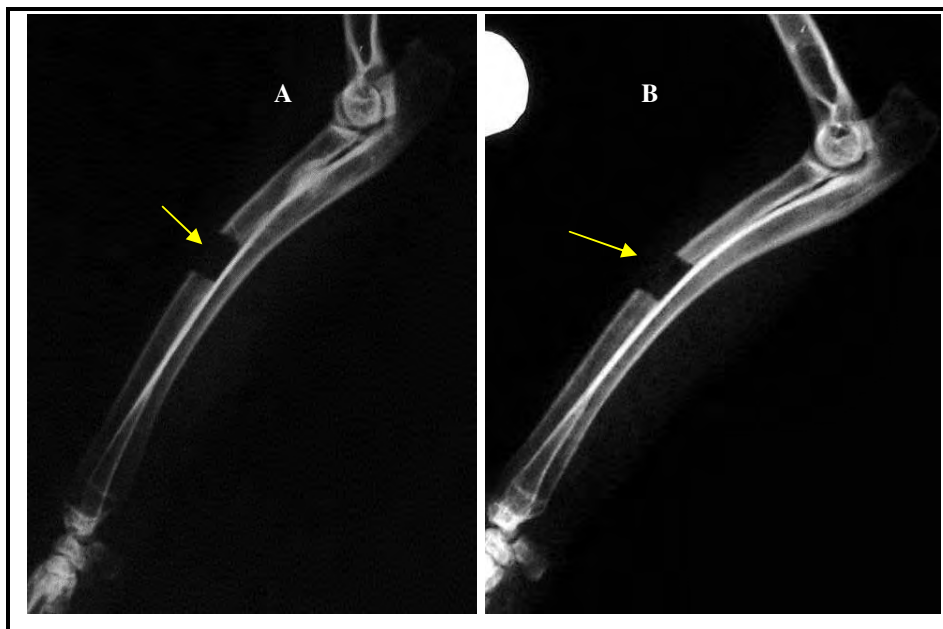


Figura 6 - Imagem radiográfica do pós-operatório imediato demonstrando a radioluscência no local da falha óssea, (A) rádio esquerdo do coelho 5 (GII), livre do gel de quitosana, e (B) rádio direito do coelho 14 (GIV) com falha óssea preenchida com gel de quitosana (setas).

No décimo quinto dia pós-operatório houve aumento da radiopacidade, compatível com crescimento ósseo, no local da falha óssea. Embora a amplitude do defeito ósseo ainda fosse grande, observou-se a presença de reação periosteal e início da formação de ponte óssea. Este fato foi observado em todos os grupos, porém, com menor intensidade nos coelhos dos grupos III e IV. Nos

coelhos destes grupos (GIII e GIV) também foi observado aumento de radiopacidade tipo tecido mole sobre o local da falha óssea, contudo, acredita-se que este seja decorrente do infiltrado inflamatório devido à presença do gel de quitosana. Os coelhos dos grupos V e VI receberam o gel de quitosana ativado com a proteína morfogenética óssea, e contrariamente ao observado nas radiografias dos coelhos dos grupos que receberam o gel de quitosana livre da proteína, não foi observado aumento da radiopacidade local decorrente da presença do gel (Figura 7).

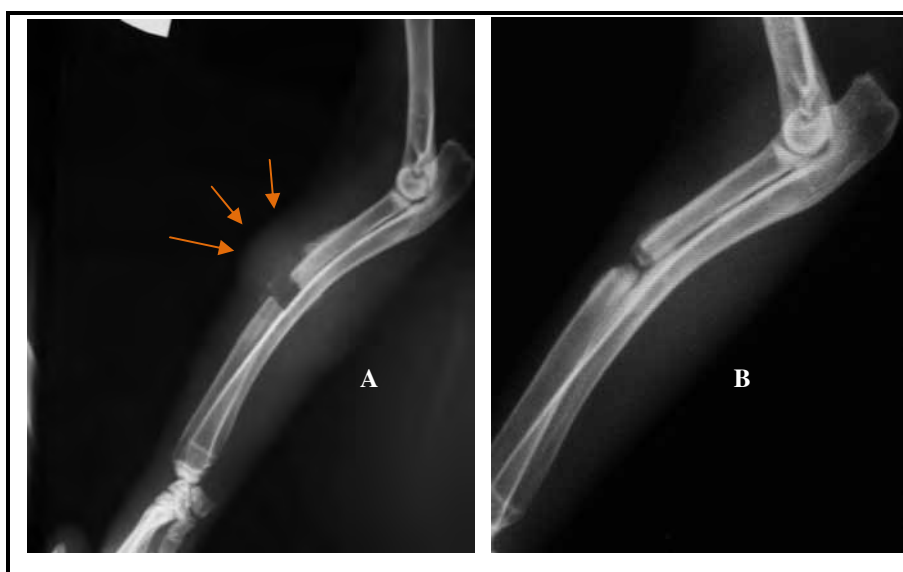


Figura 7 -Imagem radiográfica do décimo quinto dia pós-operatório do defeito ósseo em rádio de coelhos. Em A, a falha óssea foi preenchida com gel de quitosana não ativado; em B o gel introduzido na falha estava ativado com a rhBMP-2. Note a radiopacidade tipo tecido mole presente em A (setas) e ausente em B.

Considerando-se o trigésimo dia pós-operatório, foi observado aumento na radiopacidade local, com formação de ponte óssea em estágio mais avançado e redução da área de radioluscência da falha. Os melhores resultados radiográficos pertenciam aos grupos GI, GII, GV e GVI. A amplitude da área de radioluscência do defeito ósseo nas radiografias dos grupos GIII e GIV ainda eram maiores do que dos grupos restantes.

As radiografias do quadragésimo quinto dia pós-operatório revelaram que a formação de tecido ósseo novo no local da falha do rádio, foi melhor nos grupos

GI, GII, GV e GVI. Não houve o preenchimento completo de falha óssea no GIII, e apenas um no grupo GIV (coelho 16, rádio direito). A formação de ponte óssea, redução da linha radioluscente tornaram-se mais evidentes.

A Quadro 4 representa a avaliação radiológica comparativa dos grupos. Em seguida, as Figuras 8 a 13 apresentam as imagens radiográficas sequenciais representativas de cada grupo experimental.

Quadro 4 - Achados radiográficos nos diferentes grupos experimentais nos dias 15, 30 e 45 do período pós-operatório.

	REAÇÃO PERIOSTEAL	FORMAÇÃO PONTE ÓSSEA
15 dias GI	+	+
15 dias GII	+ / ++	+ / ++
15 dias GIII	-	-
15 dias GIV	- / +	- / +
15 dias GV	+	+
15 dias GVI	++	++
30 dias GI	++	++
30 dias GII	++	+++
30 dias GIII	+	- / +
30 dias GIV	+	- / +
30 dias GV	++	+++
30 dias GVI	+++	+++
45 dias GI	++	+++
45 dias GII	+++	+++
45 dias GIII	+ / ++	+ / ++
45 dias GIV	+ / ++	+ / ++
45 dias GV	+++	+++
45 dias GVI	+++	+++

(-) não observado, (+) observado com pouca intensidade, (++) observado com intensidade moderada e (+++) observado com intensidade elevada

GI - controle, GII – ultrassom, GIII-gel de quitosana, GIV - gel de quitosana e ultrassom, GV - gel de quitosana ativado com rhBMP-2 e GVI – gel de quitosana ativado com rhBMP-2 e ultrassom

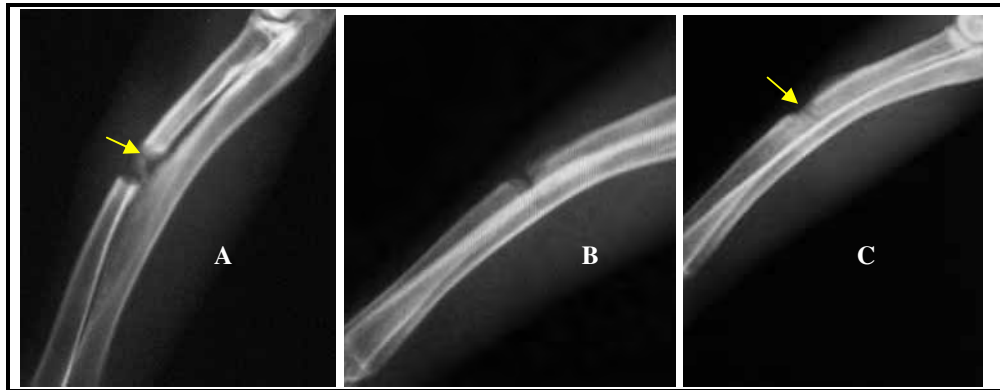


Figura 8 - Imagem radiográfica do décimo quinto (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GI (controle). Projeções médio-laterais. As setas indicam a formação de ponte óssea, denotando preenchimento parcial do defeito ósseo. Embora seja possível observar ainda uma linha de radiolucência, o preenchimento da falha foi quase completo.

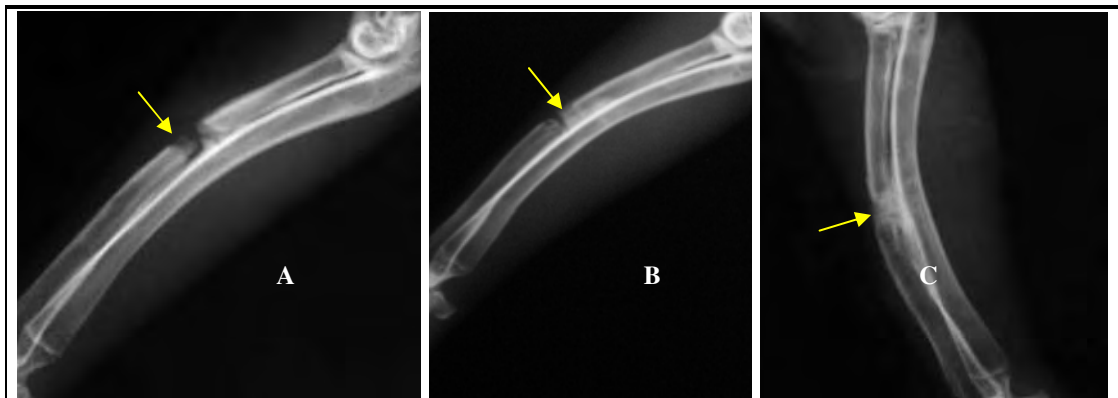


Figura 9 - Imagem radiográfica do décimo quinto (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GII (ultrassom). Projeções médio-laterais. Observe a formação de ponte óssea (seta) que preenche quase toda a falha logo no décimo quinto dia.

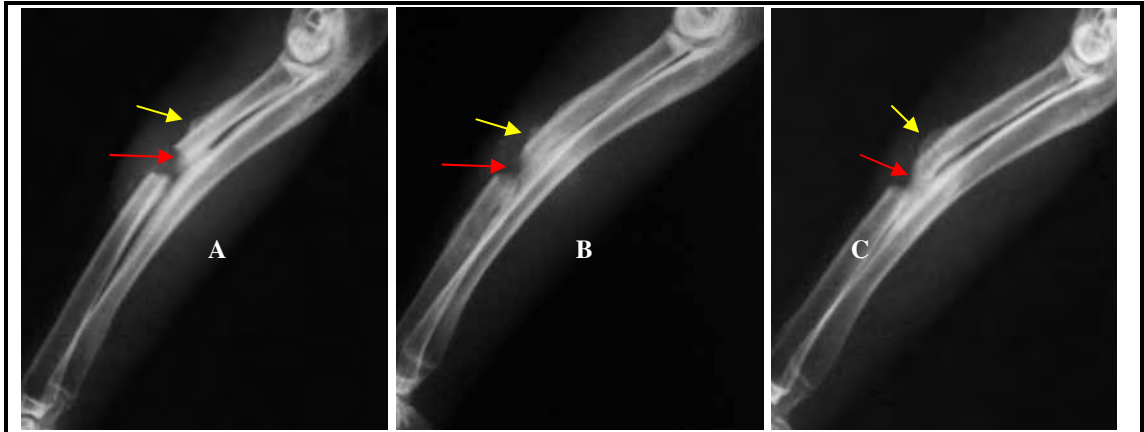


Figura 10 - Imagem radiográfica do décimo quinto (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GIII (gel de quitosana). Projeções médio-laterais. Note a reação periosteal (seta amarela) e pequena formação de ponte óssea (seta vermelha), denotando baixo preenchimento da falha óssea, até mesmo no último período de avaliação (45 dias).

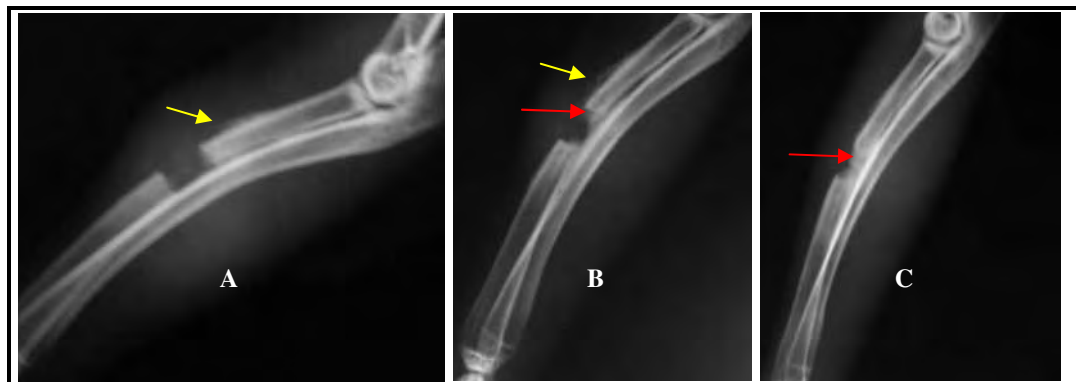


Figura 11 - Imagem radiográfica do décimo quinto (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GIV (gel de quitosana e ultrassom). Projeções médio-laterais. Note a sutil reação periosteal no décimo quinto dia (seta amarela) com baixo preenchimento da falha óssea. Apenas no trigésimo dia foi possível observar a formação de ponte óssea (seta vermelha), ainda com baixo índice de preenchimento da falha.

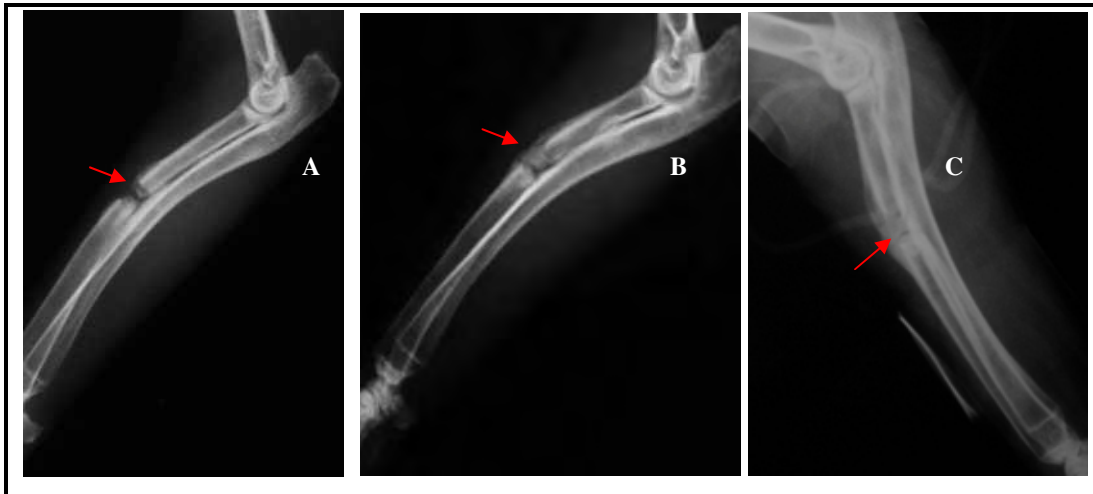


Figura 12 - Imagem radiográfica do décimo quinto (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GV (gel de quitosana ativado com rhBMP-2). Projeções médio-laterais. É possível observar o início da formação da ponte óssea (seta vermelha) já nos primeiros quinze dias (A), com aumento do preenchimento no trigésimo dia e fechamento completo da falha no quadragésimo quinto dia (C).

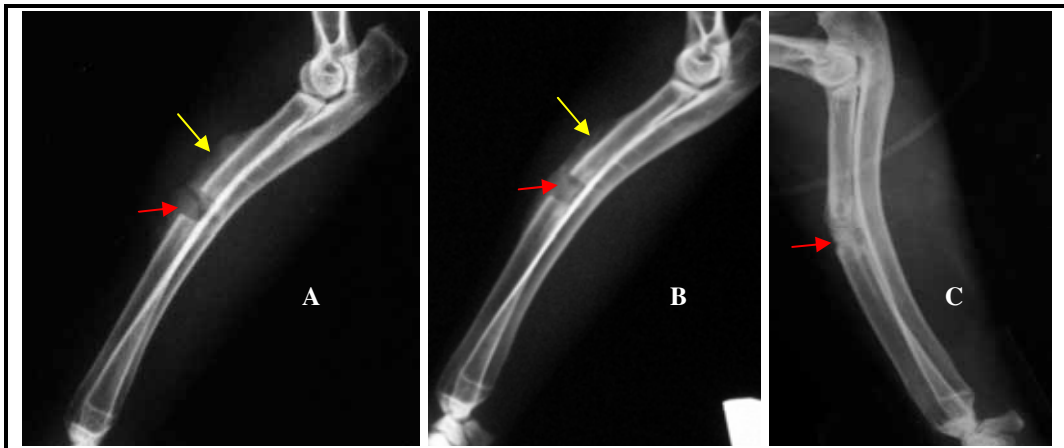


Figura 13 - Imagem radiográfica do décimo quinto (A), trigésimo (B) e quadragésimo quinto dia (C) pós-operatório de falha óssea em rádio de coelho do GVI (gel de quitosana ativado com rhBMP-2 e ultrassom). Projeções médio-laterais. Note o preenchimento quase completo da falha óssea no décimo quinto dia (A) com formação de ponte óssea (seta vermelha) e reação periosteal (seta amarela) intensa. Na última avaliação radiográfica (C), observa-se o preenchimento completo do defeito ósseo.

Em algumas radiografias dos grupos que receberam o gel de quitosana, ativado ou não, foi possível visibilizar a formação de ponte óssea lateralizada. Desta forma, justifica-se a divergência de classificação do escore radiográfico da mesma falha em diferentes projeções (médio-lateral versus crânio-caudal).

A classificação do grau de preenchimento ósseo baseou-se no sistema de escala de Lane e Sandhu (1987), e é apresentada em forma de quadros de acordo com o grupo experimental (Quadro 4 à 15)

Quadro 5 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo controle (GI) – Projeção médio-lateral

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
C1	0/0	3/3	4/4	-/-
C2	0/0	2/3	3/3	-/-
C3	0/0	0/0	3/2	3/2
C4	0/0	3/3	4/3	4/4

MLD, médio-lateral direito; e MLE, médio-lateral esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 6 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo controle (GI) – Projeção crânio-caudal

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
C1	0/0	2/2	4/3	-/-
C2	0/0	3/3	3/3	-/-
C3	0/0	0/0	2/2	3/2
C4	0/0	2/3	4/4	4/3

CrCaD, crânio-caudal direito, CrCaE, crânio-caudal esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 7 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo ultrassom (GII). – Projeção médio-lateral

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
		MLD/MLE		
C5	0/0	2/2	4/3	-/-
C6	0/0	3/4	4/4	-/-
C7	0/0	2/2	3/3	4/4
C8	0/0	3/3	3/3	4/4

MLD, médio-lateral direito; e MLE, médio-lateral esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 8 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo ultrassom (GII) – Projeção crânio-caudal

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
		CrCaD/CrCaE		
C5	0/0	2/2	4/4	-/-
C6	0/0	3/3	4/4	-/-
C7	0/0	3/2	3/4	4/4
C8	0/0	3/3	3/3	3/3

CrCaD, crânio-caudal direito, CrCaE, crânio-caudal esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 9 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana (GIII) – Projeção médio-lateral.

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
		LD/LE		
C9	0/0	0/0	1/1	-/-
C10	0/0	1/0	1/0	-/-
C11	0/0	0/1	1/1	3/2
C12	0/0	0/0	2/1	3/3

MLD, médio-lateral direito; e MLE, médio-lateral esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 10 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana (GIII) – Projeção crânio-caudal

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
CrCaD/CrCaE				
C9	0/0	0/0	2/2	-/-
C10	0/0	1/0	1/0	-/-
C11	0/0	0/1	2/3	3/3
C12	0/0	1/1	2/3	3/3

CrCaD, crânio-caudal direito, CrCaE, crânio-caudal esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 11 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e ultrassom (GIV) – Projeção médio-lateral

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
MLD/MLE				
C13	0/0	0/0	1/1	-/-
C14	0/0	1/1	2/2	-/-
C15	0/0	0/0	1/0	2/1
C16	0/0	1/0	3/2	4/3

MLD, médio-lateral direito; e MLE, médio-lateral esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 12 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e ultrassom (GIV) – Projeção crânio-caudal

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
CrCaD/CrCaE				
C13	0/0	0/0	1/1	-/-
C14	0/0	1/1	2/2	-/-
C15	0/0	0/0	1/0	2/1
C16	0/0	0/0	3/2	4/3

CrCaD, crânio-caudal direito, CrCaE, crânio-caudal esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 13 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e rhBMP-2 (GV).-Projeção médio-lateral

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
C17	0/0	3/3	4/4	-/-
C18	0/0	2/0	4/2	-/-
C19	0/0	3/2	4/3	4/3
C20	0/0	0/1	1/1	3/3

MLD, médio-lateral direito; e MLE, médio-lateral esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 14 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana e rhBMP-2 (GV) – Projeção crânio-caudal

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
C17	0/0	3/3	4/4	-/-
C18	0/0	1/0	4/1	-/-
C19	0/0	4/3	4/3	4/3
C20	0/0	0/1	1/1	3/3

Legenda: CrCaD, crânio-caudal direito, CrCaE, crânio-caudal esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 15 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo quitosana ativada com rhBMP-2 e ultrassom (GVI) –Projeção médio-lateral

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
C21	0/0	1/2	3/3	-/-
C22	0/0	4/4	4/4	-/-
C23	0/0	1/2	4/2	4/3
C24	0/0	1/1	3/3	3/3

MLD, médio-lateral direito; e MLE, médio-lateral esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Quadro 16 - Classificação radiográfica relativa ao preenchimento da falha óssea segundo a escala de Lane e Sandhu (1987) referente ao grupo controle (GVI) – Projeção crânio-caudal

COELHOS	Pós-operatória	15 dias	30 dias	45 dias
		CrCaD/CrCaE		
C21	0/0	1/2	3/3	-/-
C22	0/0	1/1	4/4	-/-
C23	0/0	2/1	3/3	4/3
C24	0/0	1/1	3/3	3/3

CrCaD, crânio-caudal direito, CrCaE, crânio-caudal esquerdo

(-): não aferido

(0) -Sem preenchimento da falha óssea, (1) – preenchimento de até 25% da falha óssea, (2) – preenchimento de até 50% da falha óssea, (3) – preenchimento de até 75% da falha óssea e (4) – falha óssea completamente preenchida (LANE e SANDHU, 1987)

Por meio do Teste de Tukey com nível de significância de 5%, foi observado que houve uma diferença estatística entre grupos, onde foi observada superioridade da média dos grupos GI, GII, GV e GVI sobre os grupos GIII e GIV.

Independentemente do grupo, a média do escore referente ao tempo de 45 dias (3,2083) foi superior à média do tempo 30 dias (2,6042); porém não houve diferença estatística entre estes períodos. Contudo os dados referentes ao tempo de 15 dias (média 1,4375) diferiram estatisticamente dos obtidos nos tempos 30 e 45 dias.

Embora se tenha notado diferença na classificação radiográfica individual frente aos diferentes posicionamentos, não houve diferença estatística entre os escores atribuídos para as radiografias em projeção médio-lateral e crânio-caudal do mesmo membro (direito ou esquerdo). Todavia, ao analisar comparativamente os dados referentes à classificação radiográfica de cada projeção de ambos os membros (direito e esquerdo), a média relativa à projeção médio-lateral direita diferiu estatisticamente das médias das outras projeções (médio-lateral esquerda, crânio-caudal direito, crânio-caudal esquerdo). Observou-se que as médias da classificação radiográfica de ambas as projeções do membro torácico direito foram superiores às médias obtidas para o membro esquerdo.

5.3 Mensuração da fosfatase alcalina (FA)

Em decorrência do processo ativo de consolidação óssea, foi constatado que a concentração sérica da fosfatase alcalina de cada coelho foi superior ao intervalo da normalidade que varia entre 4,1 e 16,2U/L (COLLINS, 1988). Contudo, o perfil cronológico crescente foi observado mais intensamente no grupo GVI, onde os coelhos receberam o gel de quitosana ativado bem como o tratamento com o ultrassom pulsado de baixa intensidade. Os grupos GI, GII e GV também apresentaram perfil crescente dos valores de FA, porém com valores médios inferiores aos do grupo GVI (figura 14).

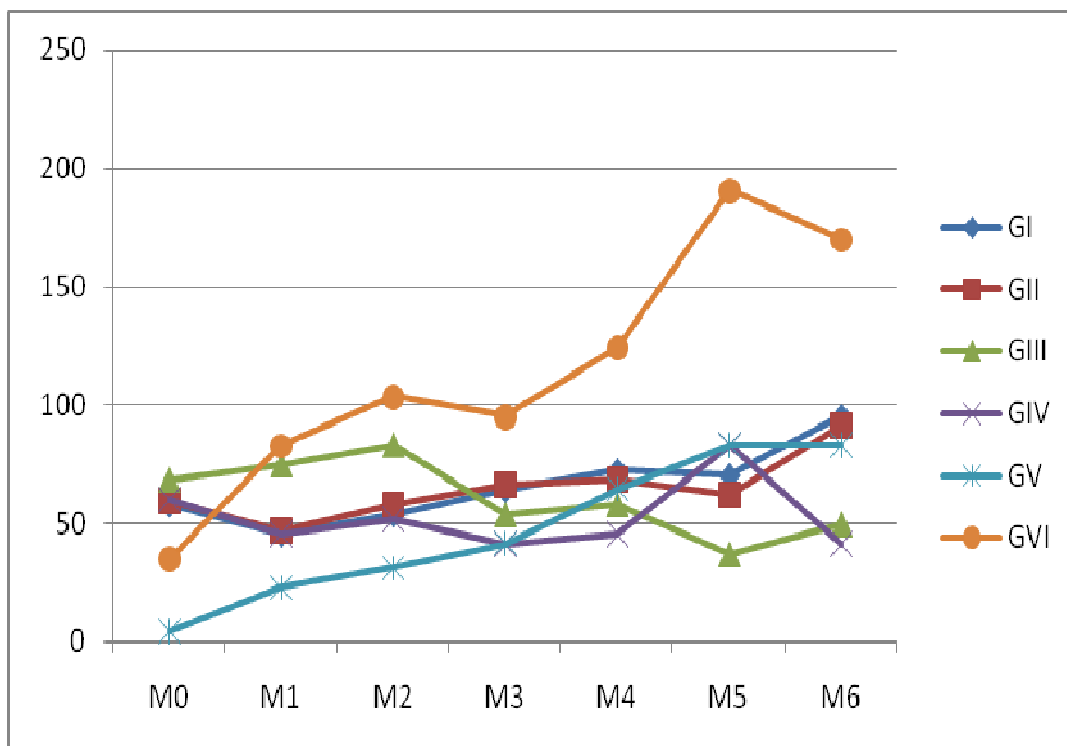


Figura 14 - Valores médios da concentração da fosfatase alcalina sérica (U/L) de coelhos pertencentes aos grupos GI, GII, GIII, GIV, GV e GVI nos diferentes momentos (M0 à M6). O perfil crescente dos valores dessa enzima sérica foi observado nos grupos GI, GII, GV e GVI, este último apresentando as maiores médias a partir de M1. O perfil dos valores da FA sérica em GIII e GIV, embora variável, foi decrescente

Por meio do Teste de Tukey a 5% de probabilidade, verificou-se que apenas os valores obtidos Grupo VI apresentaram diferença estatística em relação aos outros grupos. A mesma análise estatística permitiu verificar que não houve diferença estatística dos valores de fosfatase alcalina sérica entre os diferentes momentos de colheita (M0 à M6). Os grupos que apresentaram as maiores médias e perfil de concentração crescente são aqueles que apresentaram as melhores taxas de preenchimento do defeito ósseo, sendo o contrário verdadeiro.

5.4. Avaliação Histológica

Foi possível observar a formação de osso novo em meio à área ostectomizada nas diversas lâminas de diferentes grupos, porém este processo de consolidação óssea apresentou algumas variações decorrentes dos diferentes tratamentos aos quais os coelhos foram submetidos. Os achados histológicos referentes a cada grupo experimental são apresentados na forma de itens, de acordo com o tempo (30 e 45 dias).

5.4.1 Trinta dias

Em relação às lâminas histológicas do rádio dos coelhos eutanaziados no trigésimo dia pós-operatório, foi observada a presença de um processo ativo de consolidação óssea endocondral, com presença de uma camada de fibroblastos, condrócitos hipertrofiados, osso imaturo e maduro. Considerando-se o local ostectomia, notou-se intensa população de células osteogênicas ativas no processo de consolidação óssea, tais como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Nas amostras histológicas do grupo I, II e V, notou-se hiperplasia de tecido cartilaginoso, já nas amostras do grupo VI havia maior grau de maturação das lacunas e início de organização do osso lamelar.

Embora presente, a formação do calo e dos colares ósseos nas lâminas histológicas dos grupos III e IV parecia estar inibida frente ao grande infiltrado

inflamatório, composto por neutrófilos ativados, debris celulares, áreas de necrose e células fagocíticas que permeavam a falha óssea. Quando submetida à coloração de HE, a quitosana, que possui caráter acidofílico, adquiriu coloração vermelha intensa (Figura 15). Em todas as lâminas em que estava presente (todas do grupo III e IV, e algumas do grupo V) esta estrutura estava circundada por rico processo inflamatório compatível com reação granulomatosa de corpo estranho. Em meio a este processo inflamatório havia pouca formação de osso e, em algumas lâminas observou-se até mesmo preservação da regularidade das bordas do defeito ósseo. Neste último caso, houve crescimento ósseo apenas em porções ósseas periosteais proximais e/ou distais dos fragmentos ósseos, com pouca ou nenhuma evolução para o centro da área ostectomizada.

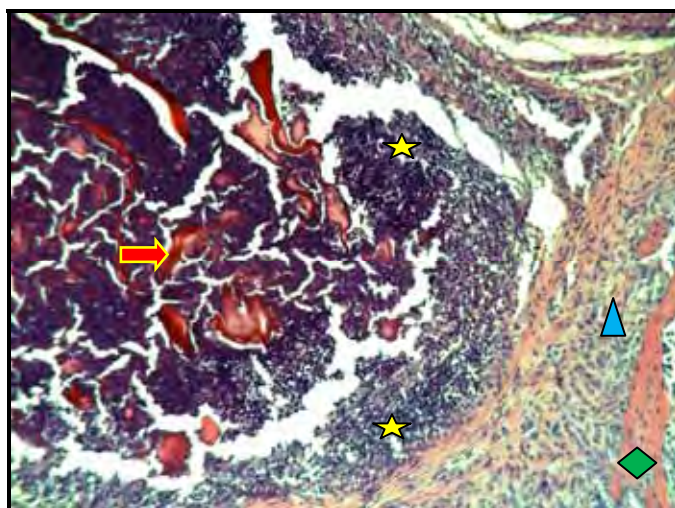


Figura 15 - Fotomicrografia da região de implante do gel de quitosana no rádio de coelho, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório em que se constata a presença de fibras de quitosana (ponta da seta vermelha), infiltrado inflamatório (estrelas amarelas), tecido fibroso (triângulo azul) e osso mineralizado (losango verde). (Histosec, HE, 40X)

Como descrito no item Material e Métodos, os coelhos dos grupos V e VI receberam o gel ativado com a rhBMP-2 contido, a quitosana caracterizada como uma estrutura vermelha descrita anteriormente foi encontrada apenas em algumas lâminas do grupo V, e em pequena quantidade no grupo VI (figura 16C e 16D). Nas lâminas

livres da presença das fibras de quitosana e do infiltrado inflamatório, observou-se melhor formação de osso novo havendo, em sua maioria, formação de ponte óssea e preenchimento parcial ou total da falha (figura 16A e 16B).

Em todos os cortes histológicos em que foi encontrada, a quitosana sempre se apresentou envolvida por infiltrado inflamatório, sem haver sinais de processo de consolidação óssea em áreas imediatamente adjacentes ao gel. No caso dos cortes histológicos do GV, a neoformação óssea não foi complicada pela presença do gel, sendo observada em apenas algumas lâminas. Quando presente notou-se organização deste processo inflamatório, circundado por tecido fibroso.

A Figura 16 apresenta os achados histológicos de cada grupo experimental dos coelhos eutanasiados aos trinta dias de pós-operatório.

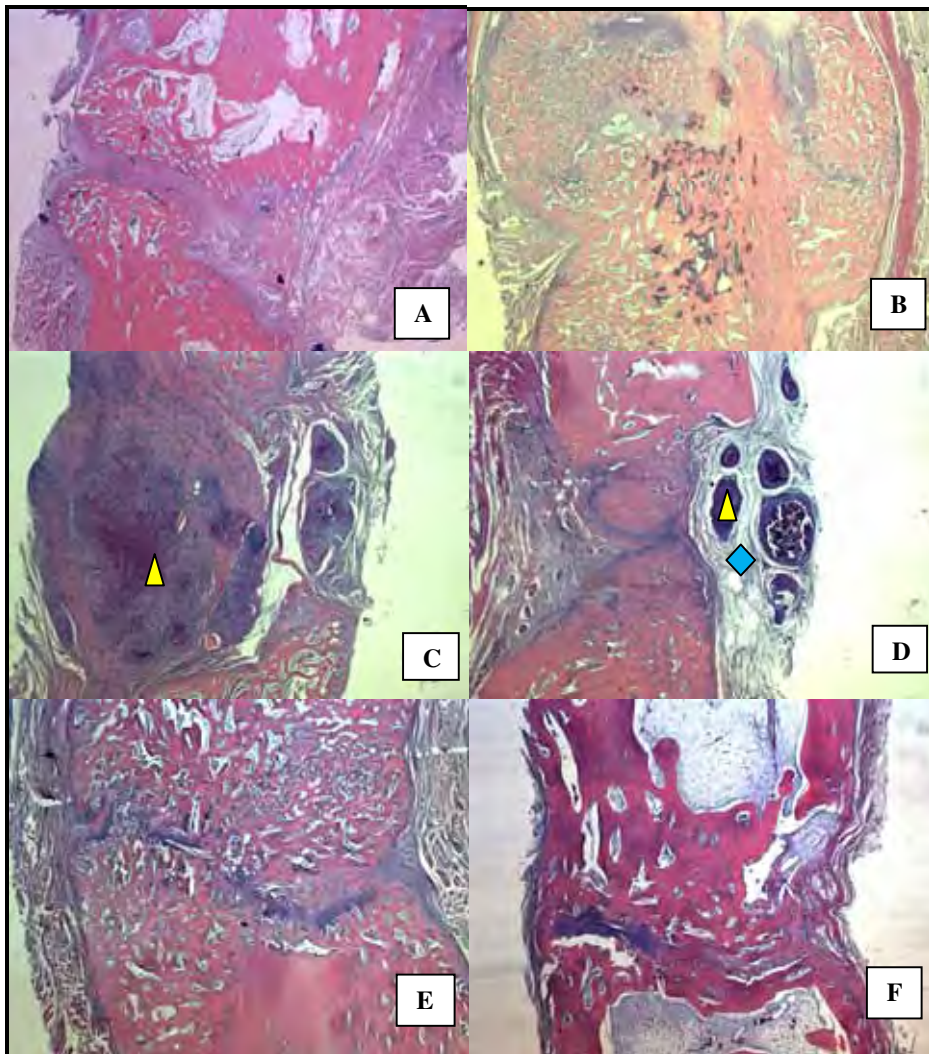


Figura 16 - Fotomicrografia de cortes das áreas de falha ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao GI (A), GII (B), GIII (C), GIV (D), GV (E) e GVI (F), eutanasiados aos trinta dias de pós-operatório. As imagens em que se observa maior quantidade de osso em meio à falha óssea são: A, B, E e F. Embora exista osso neoformado, é possível observar que o infiltrado inflamatório em C e D (triângulos amarelos) ocupam a maior área da falha. Em D nota-se que o infiltrado inflamatório é organizado, estando envolvido por tecido fibroso (losango azul). Em C, o infiltrado inflamatório que envolve o gel assume caráter não organizado (Histosec, HE, 10x).

5.4.2 Quarenta e cinco dias

Os achados nos cortes histológicos dos grupos experimentais no tempo de 45 dias foram semelhantes àqueles observados no tempo de 30 dias, porém, pode-se afirmar que a formação do osso novo e preenchimento da falha óssea foram maiores. Este fato foi mais evidente para os grupos GII e GVI, constituído em sua maior parte por osso maduro.

Tal formação do calo ósseo foi diminuta nos grupos que receberam o gel de quitosana não ativado (GIII e GIV), incluindo até mesmo aquele que recebeu a estimulação ultrassônica (GIV). A quitosana e o infiltrado inflamatório circundante também foram observados em alguns cortes histológicos do grupo GV que recebeu o gel ativado com a rhBMP-2, porém em pequena quantidade nas lâminas dos cortes que receberam o gel ativado associado a terapia com ultrassom (GVI).

Os achados histológicos da falha óssea dos coelhos eutanasiados aos 45 dias de pós-operatório são apresentados na Figura 17 e compreende todos os grupos experimentais deste estudo.

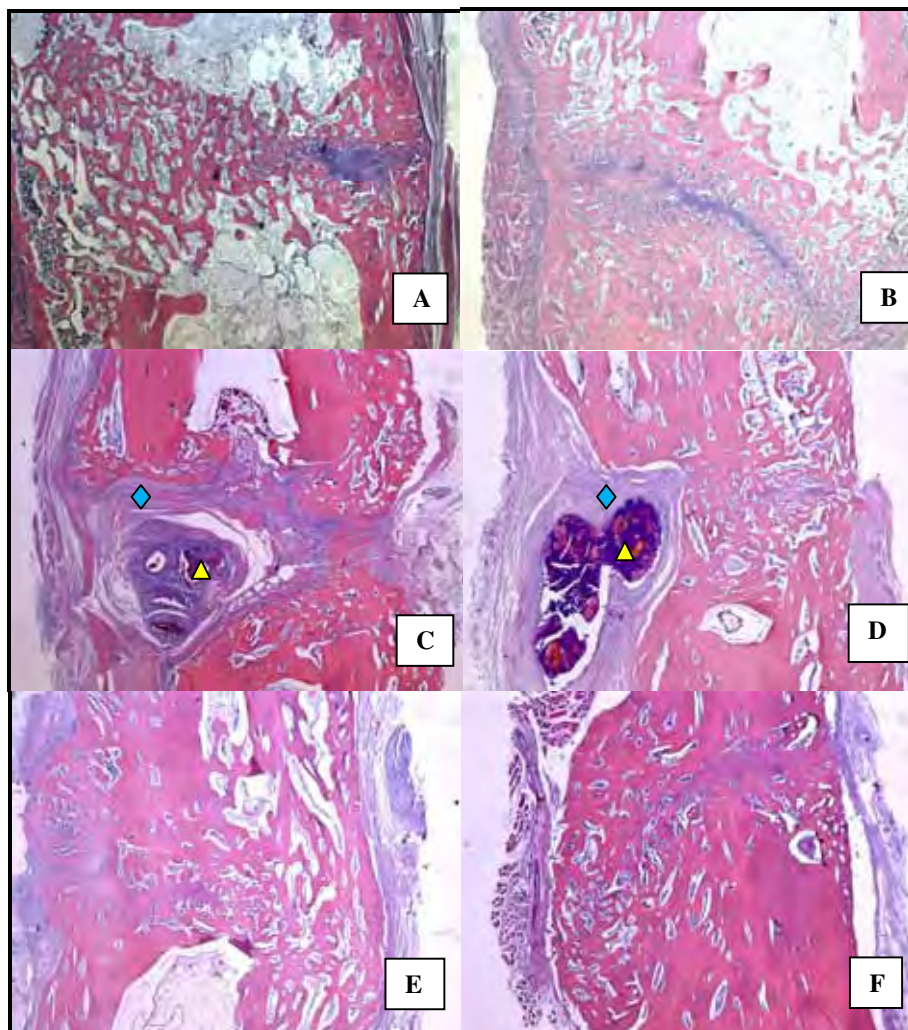


Figura 17 - Fotomicrografia de cortes das áreas de falha ósseas induzidas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos pertencentes ao GI (A), GII (B), GIII (C), GIV (D), GV (E) e GVI (F), eutanasiados aos quarenta e cinco dias de pós-operatório. Observa-se que o preenchimento da falha óssea foi mais intenso em A, B, E e F. Em C e D ainda é possível observar a permanência do gel de quitosana envolvido pelo infiltrado inflamatório (triângulo amarelo) e por tecido fibroso (losango azul). Nota-se progresso maior do processo de consolidação óssea em E e F, onde se observa a organização do osso lamelar com menor número de espaços trabeculares. (Histosec, HE, 10x).

5.5 Avaliação Histomorfométrica

Embora a escolha do campo tenha sido ao acaso, consideraram-se apenas as áreas da falha óssea. Foram feitos quatro cortes de cada falha óssea, totalizando 192 cortes histológicos. Para obtenção dos valores referentes ao índice de osteoclastos, as contagens foram repetidas em oito campos diferentes de cada corte, totalizando 768 leituras. Para a mensuração do volume trabecular ósseo e da superfície osteoblástica, o procedimento foi repetido duas vezes em cada corte histológico, totalizando 384 leituras.

5.5.1. Índice de osteoclastos

Os valores referentes ao total de osteoclastos por campo foram analisados por meio de análise estatística (Teste de Tukey com probabilidade a 5%). Verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos nem mesmo entre os tempos (30 e 45 dias). A Tabela 1 apresenta os dados referentes a este parâmetro histomorfométrico do grupo e de cada período (30 e 45 dias).

Tabela 1 - Médias e desvio padrão do número de osteoclastos observados por área (mm^2) em relação ao grupo e ao tempo (30 e 45 dias) – Índice Osteoclástico -IO

Grupo	MÉDIA 30 DIAS	MÉDIA 45 DIAS	MÉDIA GRUPO
GI	6,62 \pm 3,75	9,50 \pm 2,62	8,08 \pm 3,20
GII	8,50 \pm 5,50	6,25 \pm 2,50	7,38 \pm 4,00
GIII	9,38 \pm 5,38	7,88 \pm 6,12	8,63 \pm 5,75
GIV	8,25 \pm 2,00	16,38 \pm 7,5	12,32 \pm 4,94
GV	11,38 \pm 4,50	11,38 \pm 5,38	11,38 \pm 4,94
GVI	11,00 \pm 5,00	11,00 \pm 2,25	11,00 \pm 3,62

5.5.2 Superfície Osteoblástica

A mensuração da superfície osteoblástica demonstrou correlação direta com o preenchimento ósseo da falha, ou seja, observou-se que os maiores valores (médias por grupo) foram encontrados nos cortes histológicos dos coelhos que apresentaram melhor taxa de consolidação óssea. A Tabela 2 apresenta os dados referentes à porcentagem de superfície osteoblástica observadas em cada grupo, aos 30 e 45 dias do pós-operatório.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da porcentagem da superfície ocupada por osteoblastos (superfície osteoblástica) de acordo com o grupo, aos 30 e 45 dias.

GRUPO	MEDIA 30 DIAS %	MEDIA 45 DIAS %	MEDIA POR GRUPO %
GI	76,89±23,14	86,04±3,17	79,82±15,61
GII	86,33±2,56	82,39±16,22	84,36±10,98
GIII	69,76±46,77	87,63±3,30	78,69±32,14
GIV	81,03±3,50	77,32±19,09	79,18±12,86
GV	94,10±3,16	91,95±3,80	93,02±3,44
GVI	96,26±2,54	96,99±2,29	96,62±2,27

Por meio do teste de Tukey à 5% de probabilidade, observou-se que não houve diferença estatística dos valores relativos à superfície osteoblástica entre grupos, nem mesmo entre os tempos. Contudo, se nota que as médias estão correlacionadas diretamente com as taxas de preenchimento ósseo da falha. Ordenando os grupos em ordem decrescente, obtemos a seguinte sequência: GVI>GV>GII>GI>GIV>GIII.

5.5.3 Volume Trabecular Ósseo

As médias do volume trabecular ósseo do osso neoformado na região do defeito do rádio dos coelhos também foram maiores para os grupos que apresentaram melhores taxas de preenchimento da falha (GVI>GV>GII>GI>GIV>GIII). Estes dados são apresentados na Tabela 3 que apresenta as medias e desvio padrão de cada um dos grupos, nos diferentes tempos.

Tabela 3 - Médias e desvios padrão da porcentagem do volume trabecular ósseo de acordo com o grupo, aos 30 e 45 dias.

GRUPO	MÉDIA 30 DIAS	MÉDIA 45 DIAS	MÉDIA GRUPO
	%	%	%
GI	58,18±11,86	68,39±17,02	63,28±18,56
GII	64,90±21,68	64,08±18,86	64,49±21,59
GIII	55,00±14,44	51,75±10,94	53,38±11,99
GIV	38,86±28,18	76,75±6,18	57,81±27,69
GV	71,25±14,29	70,86±7,53	71,06±10,58
GVI	80,31±8,14	85,81±6,39	83,06±7,39

Por meio do teste de Tukey à 5% de probabilidade, observou-se que houve diferença estatística entre os grupos, onde o GVI diferiu estatisticamente do GIII. A análise permitiu também, verificar que não houve diferença estatística das variáveis em relação ao tempo. No entanto, observa-se que as maiores médias pertencem aos grupos que apresentaram as melhores taxas de preenchimento ósseo da falha. Ao ordenar os grupos de acordo com suas respectivas médias, observa-se que a mesma sequência decrescente apresentada para superfície trabecular, repete-se para esta variável (GVI>GV>GII>GI>GIV>GIII).

6 DISCUSSÃO

Embora exista extensa literatura sobre a aplicação do ultrassom pulsado de baixa intensidade no reparo das fraturas, existe pouca informação sobre seu mecanismo molecular de ação. A proteína morfogenética óssea já possui seu mecanismo de ação delineado, porém poucas pesquisas analisaram os efeitos de sua associação com ultrassom. Este estudo se propôs a avaliar os efeitos de dois tratamentos que atuam em diferentes propriedades ósseas, a osteoindução e a piezoeletricidade. Atendendo a esta proposta, empregou-se o ultrassom pulsado de baixa intensidade e a proteína morfogenética óssea como fontes de estimulação, avaliando comparativamente os resultados de cada grupo experimental, bem como da associação entre as duas terapias.

De maneira semelhante, Sant'Anna et al. (2005) analisaram os efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade, da proteína morfogenética óssea e da associação entre ambos os tratamentos sobre a expressão gênica de uma cultura de células estromais da medula óssea de ratos. Como conclusão, estes pesquisadores confirmaram a ausência da sinergia entre os dois tipos de estimulação do metabolismo celular. Com a finalidade de avaliar comparativamente os efeitos dos dois tipos de tratamentos, bem como a associação de ambos *in vivo*, se firma a importância desta pesquisa aqui descrita.

Inúmeros estudos confirmam os efeitos benéficos da estimulação ultrassônica sobre a consolidação óssea, dentre eles cita-se o recente estudo conduzido por Moraes (2006) que apresenta como conclusão a afirmativa de que o ultrassom pulsado de baixa intensidade reduz o tempo de reparação óssea de falhas induzidas em raios de coelho. O mesmo autor afirma a eficácia do implante no preenchimento da falha, tendo melhora dos resultados ao associar o tratamento ultrassônico. Pode-se afirmar que os resultados obtidos, foram semelhantes àqueles relatados por Moraes em 2006, uma vez que os achados radiográficos, histológicos e histomorfométricos dos grupos que receberam a terapia ultrassônica foram superiores aos grupos que não a receberam.

As médias histomorfométricas dos parâmetros que indicam a taxa de formação (superfície osteoblástica – SO) e a quantidade de tecido ósseo (volume trabecular ósseo – VTO) foram superiores nos grupos que receberam a terapia ultrassônica. Ou seja, os grupos GII, GIV e GVI apresentaram superioridade em relação aos grupos GI, GIII e GV respectivamente. Estes achados histomorfométricos indicam que a ação do ultrassom pulsado de baixa intensidade foi benéfica, até mesmo quando utilizado nas falhas ósseas preenchidas com a quitosana ativada ou não. Dentre todos os grupos, a média do GVI foi superior, sugerindo a hipótese de interação sinérgica entre o ultrassom e a proteína osteoindutora, fato este que contradiz a afirmação do estudo *in vitro* conduzido por Sant’anna et al. (2005).

O efeito sinérgico da proteína e do ultrassom foi confirmado também por meio da mensuração do marcador bioquímico do metabolismo ósseo, uma vez que a concentração sérica da fosfatase alcalina total está diretamente relacionada à atividade osteoblástica (MOHAMADNIA et al., 2007). As médias do GVI foram superiores as médias dos grupos restantes, o que permite a suposição de que realmente exista sinergismo entre os dois tratamentos.

A superioridade do GVI é confrontada com os resultados inferiores do preenchimento ósseo notados no GIII, em que as falhas foram preenchidas com gel de quitosana não-ativado. O baixo grau de preenchimento da falha óssea foi secundário à presença de infiltrado inflamatório que envolvia o implante gelatinoso. VandeVord et al. (2002) afirmam que a quitosana quando utilizada *in vivo*, desencadeia pouca ou nenhuma formação de cápsula fibrosa. Este fato foi observado nos cortes histológicos do grupo GIII e GV, nos quais não havia formação da cápsula. Todavia esta formação se fez presente nos cortes histológicos dos grupos que receberam o gel (ativado ou não) e a terapia ultrassônica (grupos GIV e GVI respectivamente). Acredita-se que este fato tenha ocorrido devido ao emprego do ultrassom, que possivelmente estimulou a proliferação de fibroblastos ao redor do gel de quitosana.

Toriumi e Robertson (1993) afirmam que o sucesso do material osteoindutor é dependente da eficiência do carreador. Dentre os diferentes tipos elegeu-se o gel de quitosana, que segundo López-Lacomba et al. (2006), possui os requisitos essenciais para um carreador de moléculas bioativas. Contudo os resultados obtidos pelo emprego do gel de quitosana como carreador neste experimento não foram tão consistentes. Embora nos mamíferos inexistam atividade enzimática degradativa contra a quitosana (LÓPEZ-LACOMBA et al., 2006), por meio da avaliação histológica observou-se a presença de uma reação inflamatória tipo granuloma de corpo estranho que envolvia o implante, retardando algumas vezes o processo de avanço do tecido ósseo em formação. Supõe-se que por este motivo, os resultados radiográficos, histomorfométricos e até mesmo do marcador bioquímico dos grupos GIII e GIV foram inferiores ao esperado.

No estudo *in vitro* conduzido por Arpornmaeklong et al. (2007), a esponja de quitosana mostrou-se um meio favorável ao crescimento de uma linhagem de osteoblastos de ratos, inexistindo neste caso, qualquer fator de reação imunológica. Por se tratar de um estudo *in vivo*, deve-se considerar a atuação de outros fatores, tais como respostas inflamatórias e imunológicas, o que justifica a divergência dos resultados frente ao estudo de Arpornmaeklong et al. (2007).

Embora o carreador em forma de gel dispense procedimentos cirúrgicos para sua implantação, é importante que o material possua microarquitetura que permita o crescimento de vasos e adesão dos tecidos ósseos (MARTINO, SITTINGER, RISBUD, 2005). O método de preparação do gel de quitosana conferiu ao implante a característica de baixa porosidade, e portanto pode-se supor que este fator tenha contribuído com crescimento deficitário do tecido ósseo em formação. A taxa de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao grau de desacetilação e, por conseguinte as formas com alto grau de desacetilação tendem a permanecer no tecido durante vários meses (MARTINO, SITTINGER, RISBUD, 2005). Este fato foi observado no presente estudo, pois até mesmo no 45º dia após a implantação do gel, a quitosana se fazia presente em meio à falha óssea. Já em outro estudo, afirma-se que há correlação direta entre o grau de

desacetilação da quitosana e adesão celular (MAO et al., 2004). Houve pouca adesão de células progenitoras ósseas no gel, porém a ação quimiotática positiva para neutrófilos, relatada também por Martino, Sittinger e Risbud (2005) mostrou-se presente neste estudo, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório rico em neutrófilos observado nos cortes histológicos dos grupos GIII, GIV e GV.

A falha das características osteocondutoras do gel de quitosana em coelhos foi confrontada com o bom efeito carreador do mesmo material, confirmada pelo elevado preenchimento da falha óssea nos grupos GV e GVI. Uma vez ativada com a proteína morfogenética óssea, a evolução da consolidação óssea se mostrou superior aos outros grupos, principalmente quando associada à terapia ultrassônica (GVI). Por meio deste estudo não é possível afirmar se tais resultados foram decorrentes da ação mecânica, elétrica ou térmica do ultrassom, todavia seu efeito foi benéfico e acelerou o reparo do defeito ósseo, mesmo na presença do gel de quitosana. Acredita-se que, graças a estimulação ultrassônica as médias da concentração da FA, escores radiográficos, resultados histológicos e histomorfométricos do GIV tenham sido superiores àsquelas do GIII.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi menor nos grupos que receberam a quitosana ativada, pois até mesmo nos achados radiográficos de 15, 30 e 45 dias não havia aumento de volume nem mesmo presença de radiopacidade do tipo tecido mole sobre a falha do rádio. Este achado é corroborado pelo menor infiltrado inflamatório encontrado nos cortes histológicos dos grupos GV e GVI. A discreta quantidade do carreador nas lâminas histológicas do GVI denotam que a ação da rhBMP-2 em favorecer a adesão celular e diferenciação das células progenitoras ósseas foram acentuadas pelo emprego associado do ultrassom pulsado de baixa intensidade. Acredita-se que este sinergismo favoreceu a integração do carreador ao tecido ósseo em formação.

O processo de consolidação óssea geralmente é monitorado por meio de avaliações radiográficas e clínicas seriadas do foco de fratura (DECAMP, 2003). Todavia, a distinção radiográfica entre um caso de união óssea retardada e não-união pode ser difícil. Este fato é agravado pela limitação do emprego de técnicas

de diagnóstico por imagem mais avançadas na medicina veterinária (JOHNSON; WATSON, 2000). Justifica-se assim o emprego dos marcadores ósseos neste processo de monitoração. Elegeu-se para o presente experimento, a fosfatase alcalina total como marcador bioquímico do metabolismo ósseo.

Durante o processo de consolidação óssea “normal” ocorre aumento na concentração da fosfatase alcalina sérica que retorna aos valores basais com a redução do metabolismo osteoblástico ao final da reparação da fratura. A concentração sérica da FA nos casos de não união se mantém estável e, nos casos de complicações da consolidação, ocorre elevação da concentração da FA, porém o retorno desta ao nível basal é retardado (KOMNENOU et al., 2005). Embora o perfil gráfico da concentração da FA tenha variado entre os grupos experimentais, em nenhum dos grupos houve aumento e retorno ao valor basal dentro do período de avaliação (até M4-28dias, ou até M6-42 dias). Apenas no grupo quitosana (GIII) e quitosana ultrassom (GIV) o aumento da concentração foi pequeno, havendo decréscimo da concentração no 42º dia. Nos outros grupos, a concentração da fosfatase alcalina permaneceu em níveis elevados até mesmo no quadragésimo segundo dia, assumindo perfil crescente sem nenhum indício de retorno aos valores basais. Embora a expressão do pico de concentração e os perfis sejam variáveis nas diferentes espécies, por meio dos resultados é possível supor que nos grupos GI, GII, GV e GVI a atividade osteoblástica se manteve ativa até mesmo nos períodos mais avançados de avaliação.

Uma vez que todos os animais apresentavam-se hígidos e não receberam qualquer fármaco com ação anti-inflamatória, acredita-se que este aumento tenha sido decorrente do processo ativo de reparo da falha óssea.

Acredita-se que a fosfatase alcalina eleita como marcador bioquímico do metabolismo ósseo neste experimento, foi fiel aos acontecimentos, pois os resultados foram paralelos aos achados radiográficos, e até mesmo ao parâmetro histomorfométrico relacionado à taxa de formação óssea (superfície osteoblástica).

Em condições “normais”, o defeito ósseo que receba um implante com características osteocondutoras e osteoindutoras, certamente terá o processo de

consolidação melhorado. Uma vez que a quitosana mostrou-se um bom carreador da rhBMP-2, acredita-se que para garantir a superioridade do reparo ósseo, a quitosana deve ser projetada para atuar também como arcabouço para o crescimento ósseo, ou seja, atuar também como material osteocondutor.

7 CONCLUSÕES

Por meio deste estudo, foi possível concluir que:

- O ultrassom pulsado de baixa intensidade acelerou o processo de preenchimento da falha óssea em rádio de coelhos em todas as situações produzidas neste experimento.
- O gel de quitosana, com grau de desacetilação de 75% induziu um processo inflamatório em coelhos e atrasou o preenchimento da falha óssea
- O gel de quitosana embora tenha induzido a reação inflamatória, mostrou-se um bom carreador para a rhBMP-2, acelerando o processo de consolidação óssea em coelhos.
- Houve sinergismo entre a aplicação do ultrassom pulsado de baixa intensidade e a proteína óssea morfogenética, confirmado pelos resultados superiores apresentados pelo grupo GVI.

REFERÊNCIAS

ALBAROVA, J.G. et al. The In vivo behavior of a sol-gel glass and glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. **Biomaterials**, Guildford, v.26, n.16, p.4374-4382, 2005.

ALLEN, M.J. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.32, n.3, p.101-113, 2003.

ARDEN, N.I.; JANES, J.M.; HERRICK, J.F. Ultrasonic energy and surgically defects produced in bone. **The Journal of Bone Joint Surgery**, London, v.39, n.2, p.394-402, Apr. 1957.

ARPORNMAEKLONG, P. et al. Growth and defferentiaton of mouse osteoblasts on chitosancollagen sponges. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Guildford, v.36, n.4, p.328-337, 2007.

AZUMA, Y. et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. **Journal of Bone Mineral Research**, London, v.16, n.4, p.671-680, 2001.

BEHARI, J.; SINGH, S. Ultrasound propagation in "in vivo" bone. **Ultrasonics**, Surrey, v.19, n.2, p.87-90, Mar. 1981.

BENDER, L.F.; JANES, J.M.; HERRICK, J.F. Histologic studies following exposure of bone to ultrasound. **Archives of Physical Medicine Rehabilitation**, New York, v.35, n.9, p.555-559, 1954.

BETTI, L.V. **Análises microscópica e radiográficas do reparo ósseo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**. 2004. 152f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2004.

BLACK, A. et al. Diurnal variation and age differences in the biochemical markers of bone turnover in horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, n.1, p.75-83, Jan. 1999.

BOUXSEIN, M.L. et al. Recombinat human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. **Journal of Bone Joint Surgery**, London, v.83, n.8, p.1219-1230, Aug. 2001.

BRAUN, W. et al. Die Plattenosteosynthese zur behandlung offener femurschaftfrakturen. **Aktuelle Traumatologie**, New York, v.21, n.5, p.189-193, 1991.

BUSSE, J.W. et al. The Effect of low intensity pulsed ultrasound therapy on time of fracture healing: a meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, Montreal, v.166, n.4, p.437-441, Feb. 2002.

CALORI, G. M. et al. An ongoing research for evaluation of treatment with BMPs or AGFs in long bone non-union: Protocol description and preliminary results. **Injury**, Bristol, v. 37, n. 3, p. 43- 50, Sept. Supplement, 2006.

CARRO, A.P.M.C. **Uso da matriz óssea desmineralizada associada a estimulação ultra sônica pulsada de baixa intensidade na correção da falha óssea**: estudo experimental. 1998. 49f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som pulsado de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas**. 2001. 82p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CHANG, W.H. et al. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. **Bioelectromagnetics**, New York, v.23, n.4, p.256-263, May 2002.

CHEN, Y.J. et al. Pertussis toxin-sensitive galphai protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts (1). **FEBS Letters**, Amsterdam, v.554, n.1-2, p.154-158, Nov. 2003.

CHRISTGAU, S. et al. Serum crosslaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. **Bone**, Elmsford, v.26, n.5, p.505-511, May 2000.

CLAES, L.; WILLIE, B. The Enhancement of bone regeneration by ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, New York, v.93, n.1-3, Jan./Apr. p.394-398, 2007.

COLLINS, B.R. Common diseases and medical management of rodents and lagomorphs. In: JACOBSON, E.R.; KOLLIAS JR., G.V. (Ed.). **Exotic animals**. New York: Churchill Livingstone, 1988. p. 261-306. (Contemporary Issues in Small Animal Practice, 9).

CORRADI, C.; COZZOLINO, A. Ultrasound and bone callus formation during function. **Archivio di Ortopedia**, Milano, v.66, p.77-98, 1953.

DE NUNNO, R. L'azione degli ultrasuoni sulla formazione del callo osseo (ricerche sperimentali). **Annali Italiani de Chirurgia**, Napoli, v.29, p.211-220, 1952.

DECAMP, C. E. Delayed / nonunion fractures. **Proceedings of North American Veterinary Conference**. Orlando, p. 755-756, 2003.

DELAURIER, A. et al. A Comparison of methods of measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.77, n.1, p.29-39, Aug. 2004.

DEMPSTER, D.W. New concepts in bone remodeling. In: SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego: Academic Press, 1999. Cap.18, p.261-273.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, Bristol, v.36, n.12, p.1392-1404, Dec. 2005.

DUARTE, L.R. The Stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery**, Berlin, v.101, n.3, p.153-159, Apr. 1983.

DYSON, M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. **British Journal of Cancer**, London, v.45, p.165, 1982.

ECKARDT, H. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. **Injury**, v. 36, n. 4, p. 489-494, abril 2005

EDWARDS III, R.B. et al. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.86, n.7, p.1425-1438, July 2004.

EINHORN, T.A. Enhancement of fracture-healing. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.77, n.6, p.940-956, June 1995.

EINHORN, T.A. The Cell and molecular biology of fracture healing. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v.355S, p.7-21, 1998.

EINHORN, T.A. et al. A Single percutaneous injection of recombinant human morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.85, n.8, p.1425-1435, Aug. 2003.

EUGENE, K., LEE, Y. L. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, Oxford, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003

FLECKNELL, P.A. et al. Laboratory animals. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. **Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4.ed. Oxford: Blackwell, 2007. Cap.30, p.765-784.

FRANCESCHI, R.T. The Developmental control of osteoblast specific gene expression: role of specific transcription factors and extracellular matrix environment. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Boca Raton, v.10, n.1, p.40-57, 1999.

FRIEDLAENDER, G.E. et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.83, pt. 2, Suppl.1, p.S151-S158, Apr. 2001.

FROST, H.M. The Regional acceleratory phenomenon: a review. **Henry Ford Hospital Medical Journal**, Detroit, v.31, p.3-9, 1983.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On The piezoelectric effect of bone. **Journal of the Physical Society of Japan**, Tokyo, v.12, n.10, p.1158-1162, Oct. 1957.

FYFE, M.C.; CHAHL, I.A. Mast cell degradation: a possible mechanism of action of therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, Suppl.1, p.62, 1982.

GEESINK, R.G.; HOEFNAGELS, N.H.; BULSTRA, S.K. Ostrogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.81B, n.4, p.710-718, July 1999.

GERLANC, M. et al. Ultrasonic study of normal and fractured bone. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v.111, p.175-180, 1975.

GIANNOUDIS, P.V.; TZIOUPIS, C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. **Injury**, Bristol, v.36S, Suppl.1, p.S47-S50, July 2005.

HANSSON, L.I.; STENSTROM, A.; THORNGREN, K.G. Diurnal variation of longitudinal bone growth in the rabbit. **Acta Orthopaedica**, Basengstoke, v.45, n.1, p.499-507, 1974.

HARCOURT-BROWN, F. **Textbook of rabbit medicine**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2002. p.140 -164.

HECKMAN, J.D. et al. Acceleration of tibial fracture healing by non invasive, low intensity pulsed ultrasound. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.76, n.1, p.26-34, Jan. 1994.

HERRICK, J.F.; JANES, J.M.; ARDAN JR., N.I. Experimental studies relative to the therapeutic use of ultrasound. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.128, n.12, p.571-577, June 1956.

ILLERA, J.C. et al. Variaciones fotoperiódicas de algunas constantes de la bioquímica sanguínea del conejo. **Revista Española de Fisiología**, v. 48, n. 1, p. 7-12, 1992.

JENKINS, J.R. Rabbit and ferret liver and gastrointestinal testing. In: FUDGE, A.M. (Ed.). **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B.Saunders, 2000. p.291-304.

JOHNSON, K.A.; WATSON, A.D.J. Skeletal diseases. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine diseases of the dog and cat**. 5thed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2000. p.1887-1916.

JONES, A.A. et al. The Effect of rhBMP-2 around endosseous implants with and without membranes in the canine model. **Journal of Periodontology**, Birmingham, v.77, n.7, p.1184-1193, 2006.

JORGETTI, V. **Biópsia óssea e análise histomorfométrica**. 2007. Disponível em: <<http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualDoencas/Pages/bi%C3%B3psia%C3%B3sseaan%C3%A1lisehistomorfom%C3%A9trica.aspx>>. Acesso em: 21 mar. 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAPLAN, F.S. et al. Form and function of bone. In: SIMON, S.R. **Orthopaedic basic science**. Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.

KIM, I-Y et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n.1, p. 1-21, 2008

KLEEREKOPER, M. Biochemical markers of bone remodeling. In: KLEEREKOPER, M.; SIRIS, E.S.; McCHUNG, M. **The Bone and mineral manual**. 2nded. Amsterdam: Elsevier; Academic Press, 2005. Cap.4, p.17-20.

KLUG, W.; KNOCH, H.G. Durch biophysikalische untersuchungen quantifizierung der knochenbruchheilung nach ultraschallstimulazion von distalen raiusfrakturen. **Beitraege zur Orthopaedie und Traumatologie**, Berlim, v.33, H 8, p.384-391, 1986.

KLUG, W.; FRANKE, W.G.; KNOCH, H.G. Scintigraphic control of bone fracture healing under ultrasonic stimulation: an animal experimental study. **European Journal of Nuclear Medicine**, Berlin, v.11, n.12, p.494-497, 1986.

KOMNENOU, A. et al. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with healing processo f long bone fractures in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.34, n.1, p.35-38, Mar. 2005.

KRISTIANSEN, T.K. et al. Acceleration healing of distal radial fractures with the use specific, low intensity pulsed ultrasound: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.79, n.7, p.961-973, July 1997.

LANE,J.M.; SANDHU, H.S. Current approaches to experimental bone grafting. **Orthopedic Clinics of North America**, Philadelphia, v.18, n.2, p.213-225.

LEPAGE, O.M. et al. Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlations with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.55, n.1, p.5-10, 1991.

LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T.A. The Role of growth factors in the repair bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.84, n.6, p.1032-1044, June 2002.

LINKHART, T.A.; MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. **Bone**, Elmsford, v.19, n.1, Suppl.1, p.1S-9S, July 1996.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som de 1 MHz com a frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no tratamento de fratura de fíbula**

de rato. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

LIRANI, A.P.R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v.49, n.6, p.891-896, Dez. 2005.

LÓPEZ-LACOMBA, J.L. et al. Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration. **Biomacromolecules**, Washington, v.7, n.3, p.792-798, Mar. 2006.

LOW, J.; REED, A. Ultra-som terapêutico. In: ELETROTERRAPIA explicada: princípios e prática. 3.ed. São Paulo: Manole, 2001. p.187-228.

MAINTZ, G. Tierexperimentelle untersuchungen über die wirkung der ultraschallwellen auf die knochenregeneration. **Strahlentherapie**, Berlim, v.82, p.631-638, 1950.

MALIZOS, K.N. et al. Low intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. **Injury**, Bristol, v.37S, Suppl.n.1, p.S56-S62, Apr. 2006.

MAO, J.S. et al. A Preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. **Biomaterials**, Kidlington, v.25, n.18, p.3973-3981, 2004.

MARTINO, A.D.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, Kidlington, v.26, n.30, p.5983-5990.

MAYR, E.; FRANKEL, V.; RUTER, A. Ultrasound – an alternative healing method for nonunions?. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, Berlim, v.120, n.1-2, p.1-8, Jan. 2000.

MCKIBBIN, B. The Biology of fracture healing in long bones. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.60-B, n.2, p.150-162, May 1978.

MEYER, R.A. et al. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.2, n.2, June 2001. Disponível em:<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2474-2-2-pdf>>. Acesso em:15 Jan. 2009

MOHAMADNIA, A.R. et al. Bone-specific alkaline phosphatase as good indicator of bone formation in sheepdogs. **Comparative Clinical Pathology**, Berlim, v.16, n.4, p.265-270, Nov. 2007.

MORAES, P.C. **O Uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio**. 2006. 44f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MORTIMER, A.J.; DYSON, M. The Effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, v.14, n.6, p.499-506, 1988.

MÜHLBAUER, R.C.; FLEISCH, H. The Diurnal rhythm of bone resorption in the rat. Effect of feeding habits and pharmacological inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, Philadelphia, v.95, n.4, p.1933-1940, Apr. 1995.

NARUSE, K. et al. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low intensity pulsed ultrasound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.268, n.1, p.216-220, Feb. 2000.

NARUSE, K. MIYAUCHI, A.; ITOMAN, M.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.. Distinct anabolic response of osteoblast to low intensity pulsed ultrasound. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v.18, p.360-369, 2003.

NISHIDA, Y. et al. Osteogenic protein 1 stimulates cell associated matrix assembly normal human articular chondrocytes up regulation of hyaluronan synthase, CD, 44 and aggrecan. **Arthritis and Rheumatism**, Malden, v.43, n.1, p.206-214, Jan. 2000.

PARFITT, A.M. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (Summary of a proposed system). **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.2, p.595-610, 1988.

PARK, D. et al. Injectable bone using chitosan-alginate/mesenchymal stem cells/bmp-2 composites. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, Stuttgart, v.33, n.1, p.50-54, Feb. 2005.

PASKALEV, M.; KRSTEV, S.; FILIPOV, J. Changes in some serum bone markers after experimental fracture and intramedullary osteosynthesis in dogs. **Trakia Journal of Sciences**, Bulgaria, v.3, n.5, p.46-50, 2005.

PEDERSEN, B.J. et al. Circadian rhythm in type I collagen formation in postmenopausal women with and without osteopenia. **Osteoporosis International**, Berlin, v.5, n.6, p.472-477, Nov. 1995.

PERKA, C. et al. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioabsorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. **Biomaterials**, Guildford, v.21, n.11, p.1145-1153, June 2000.

PHILLIPS, A.M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, Bristol, v.36S, Suppl.1, p.S5-S7, Nov. 2005.

PIZZARELLO, D. J. et al. Effect of pulsed low-power ultrasound on growing tissues. **Experimental Cell Biology**, Basel, v. 46, n. 4, p. 179-191, 1978.

PRICE, C.P. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v.30, p.355-372, 1993.

RAFFI, M.B.; MENDÉZ, M.C.; RIET-CORREA, F. Estudos histomorfométrico e histológico das lesões ósseas causadas por flúor em aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v.17, n.2, p.69-76, abr./jun. 1997.

REDDI, A.H. Morphogenetic messages are in extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v.28, pt.4, p.345-349, 2000.

REHER, P. et al. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, Amsterdam, v.11, n.6, p.416-423, June 1999.

REVELL, P.A. Histomorphometry of bone. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.36, p.1323-1331, 1983.

RUBIN, C. et al. The Use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v.83, n.2, p.259-270, Feb. 2001.

SAKOU, T. (1998). Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**, Elmsford, v.22, n.6, p.591-603, 1998.

SANT'ANNA, E.F. et al. Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.23, n.3, p.646-652, May 2005.

SANTOS, A.A. et al. O Papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.13, n.4, p.194-195.

SCHMAEDECKE, A. et al. Tratamento cirúrgico de não união retardada e não união de fratura em cães: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, São Paulo, v.6, n.1/3, p.74-82, 2003.

SCHMITT, J.M. et al. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.17, p.269-278, 1999.

SEEHERRMAN, H.; WOZNEY, J.; LI, R. Bone morphogenetic protein delivery systems. **Spine**, Philadelphia, v.27, Suppl.n.16S, p.S16-S23, Aug. 2002.

SIMONIS, R.B.; GOOD, C.; COWELL, T.K. The Treatment of nonunion by pulsed electromagnetic fields combined with denham external fixator. **Injury**, Bristol, v.15, n.4, p.255-260, Jan. 1984.

SOUBERBIELLE, J.C.; CORMIER, C.; KINDERMANS, C. Bone markers in clinical practice. **Current Opinion in Rheumatology**, Philadelphia, v.11, n.4, p.312-319, July 1999.

SOUSA, V.L. **Efeitos do ultra-som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fraturas de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*)**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

STEIN, G.A.; ANZEL, S.H. Review of delayed unions of open tibia fractures treated with external fixation and pulsing electromagnetic fields. **Orthopedics**, Throfore, v.7, p.428-436, 1984.

- TAKAHASHI, Y. et al. Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. **Tissue Engineering**, New Rochelle, v.13, n.2, p.293-300, Feb. 2007.
- TAKIKAWA, S. et al. Low intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **Journal of Ultrasound in Medicine**, Laurel, v.20, n.3, p.197-205, Mar. 2001.
- TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.6, p.943-948, 2002.
- TONNA, E.A.; SINGH, I.J.; SANDHU, H.S. Autoradiografic investigation of circadian rhythms in alveolar bone periosteum and cementum in young mices. **Histology and Histopathology**, Murcia, v.2, p.129-133, 1987.
- TORINUMI, D.M.; ROBERTSON, K. Bone inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. **Facial Plastic Surgery**, New York, v.9, p.29-36, Jan. 1993.
- ULUDAG, H. et al. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlatuon between protein pharmacokinetics and osteoinduction in rat ectopicmodel. **Journal of Biomedical Materials Research – pt.A**, New York, v.50, n.2, p.227-238, Maio 2000.
- URIST, M. Bone: formation by autoinduction. **Science**, Washington, v.150, n.3698, p.893-899, Nov. 1965.
- URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **Journal of Dental Research**, Michingam, v.50, n.6, p.1392-1406, Nov. 1971.
- URIST, M.R.; MIKULSKI, A.; LIETZI, A. A Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, n.4, p.1828-1832, Apr. 1979.
- URIST, M.R.; O'CONNOR, B.T.; BURWELL, R.G. **Bone graft, derivatives and substitutes**. Oxford: Butterworth –Heinemann, 1994.
- VAIBHAV, B. et al. Bone morphogenetic protein and its application in trauma cases: a current concept update. **Injury**, Bristol, v.38, n.11, p.1227-1235, Nov. 2007.
- VANDEVORD, P. J. et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 59, n. 3, p.585-590, 2002.
- XAVIER, C.A.M.; DUARTE, L.R. Aplicação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.18, n.3, p.73-80, 1983.
- WATTS, N.B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, Danvers, v.45, n.8, p.1359-1368, Aug. 1999.

WELGUS, H.G.; JEFFERY, J.J.; EISEN, A.Z. Human skin fibroblast collagenase. Assessment of activation energy and deuterium isotope effect with collagenous substrates. **Journal of biological Chemistry**, Bethesda, v.256, n.18, p.9516-9521, Sept. 1981.

WENDENBERG, B. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85. **Acta Orthopaedica Scandinavica, Supplementum**, Copenhagen, v.52, p.1-79, 1961.

WESTERHUIS, R.J.; VAN BEZZOIJEN, R.L.; KLOEN, P. Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. **Injury**, Bristol, v.36, n.12, p.1405-1412, Dec. 2005.

WOZNEY, J.M. et al. Novel regulators of bone formation molecular clones and activities. **Science**, Washington, v.242, n.4885, p.1528-1534, Dec. 1988.

WU, J.R.; DU, G.H. Temperature elevation generated by a focused Gaussian ultrasonic beam at a tissue-bone interface. **Journal of the Acoustical Society of America**, Melville, v.87, n.6, p.2748-2755, June 1990.

YANG, K.H.; PARK, S.J. Stimulation of fracture healing in a canine ulna full-defect model by low-intensity pulsed ultrasound. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v.42, n.5, p.503-508, Oct. 2001.

YONG, S.R.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, v.16, n.8, p.809-816, 1990.